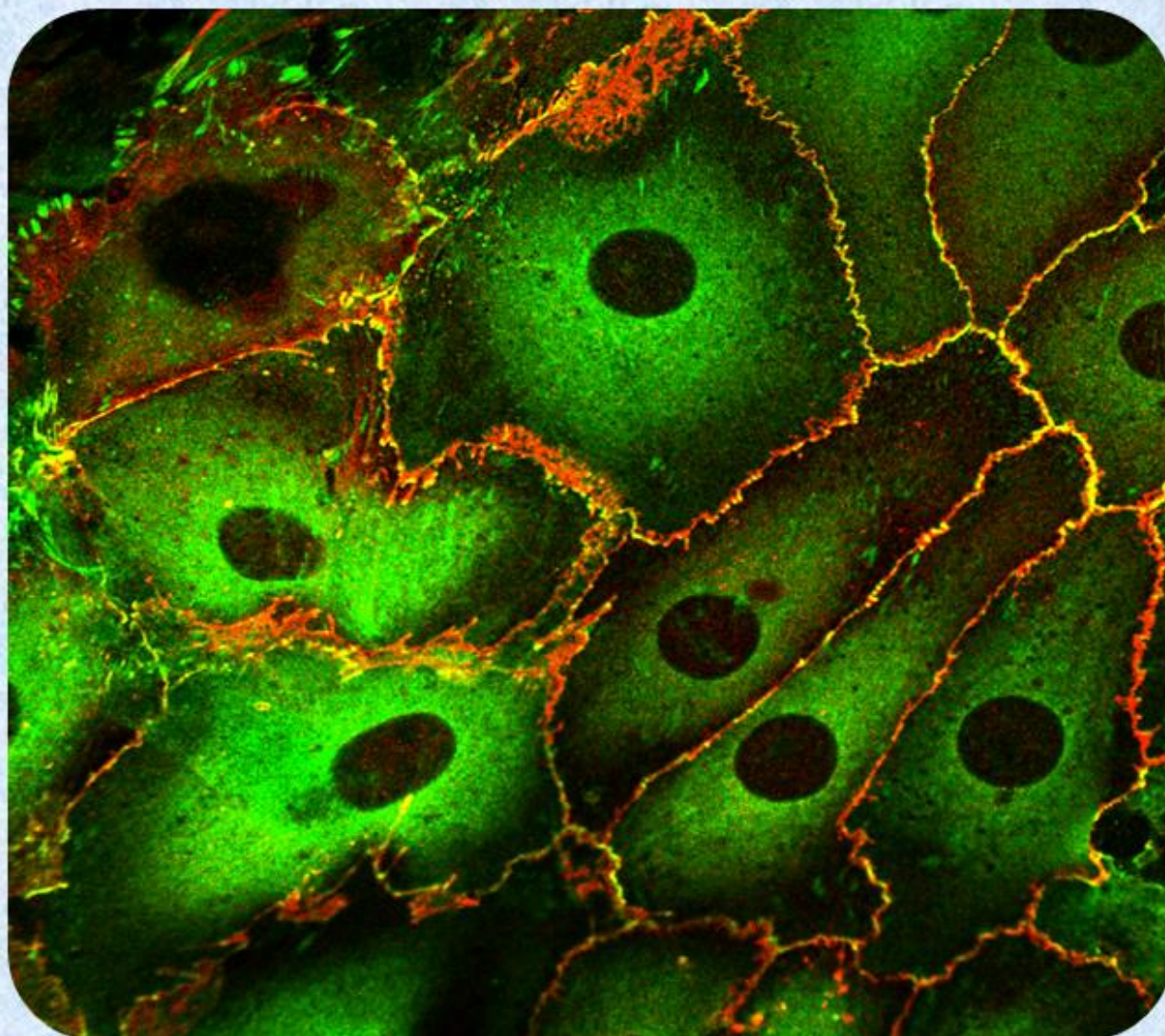


**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA Y DE
LA PARTICIPACIÓN DE VINCULINA EN EL
MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE
ADHESIÓN CELULAR EN LOS TÚBULOS
COLECTORES DE LA PAPILA RENAL**



Bioquímica Yamila Romina Brandán

Directora de Tesis: Dra. María Gabriela Márquez

Consejero de Estudios: Dr. Fernando Pablo Dominici

Facultad de Farmacia y Bioquímica -Universidad de Buenos Aires

2016



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA Y DE LA
PARTICIPACIÓN DE VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO
DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR EN LOS
TÚBULOS COLECTORES DE LA PAPILA RENAL**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES**

BIOQUÍMICA YAMILA ROMINA BRANDÁN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA GABRIELA MÁRQUEZ

CONSEJERO DE ESTUDIOS: DR. FERNANDO PABLO DOMINICI

LUGAR DE TRABAJO

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Humana (IICSHUM)

Centro de Investigaciones e Innovación Tecnológica (CENIIT)

Universidad Nacional de La Rioja



La Rioja, Noviembre 2016





FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR DE LA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MARÍA GABRIELA MÁRQUEZ

CONSEJERO DE ESTUDIOS
DR. FERNANDO PABLO DOMINICI

AUTOR
BIOQUÍMICA YAMILA ROMINA BRANDÁN

A la Dra. María Gabriela Márquez por confiar en mí y abrirme la puerta al mundo de la ciencia, inicialmente dejando que forme parte de la Cátedra de Biología General y Celular de las carreras de Bioquímica y Farmacia de la UNLaR siendo aún una estudiante sin experiencia, y luego por darme la posibilidad de realizar un postgrado bajo su continua supervisión y apoyo.

Al Dr. Fernando Pablo Dominici por haber aceptado ser mi Consejero de estudios, y ofrecer su apoyo y buena predisposición.

A la Dra. Norma Sterin-Speziale por su invalorable aporte durante el desarrollo del doctorado y especialmente en la corrección de la tesis.

Al Dr. Nicolás Favale, Dra. Lucila Pescio y el Farm. Bruno Santacreu por el apoyo, asesoramiento y colaboración en la realización de los experimentos.

A la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por permitirme el uso de sus instalaciones y manejo de equipos.

Al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas y Espectrometría de Masa (Lanais Pro Em-Conicet), en la persona de Carlos Paván por el asesoramiento y apoyo técnico en la realización de los análisis de espectrometría de masa.

A Roberto Fernández por su buena predisposición y su gran ayuda con el uso del microscopio de fluorescencia confocal perteneciente al Servicio de Microscopia Confocal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Al Centro de Microscopia Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, en la persona del Dr. Ricardo Fretes por los estudios de microscopía electrónica de transmisión

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado una beca para la realización de mi tesis doctoral.

A la Universidad Nacional de La Rioja por haberme permitido adquirir la formación de grado, y también por brindarme un lugar físico en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la

Salud Humana, que funciona dentro del Centro de Investigaciones e Innovación Tecnológica, para la realización de mi tesis doctoral.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por haberme brindado la posibilidad de obtener un título de postgrado.

Desde una perspectiva personal, esta tesis está dedicada a mi familia, pero principalmente a mis padres, quiénes me enseñaron a luchar y esforzarme para alcanzar mis metas, y que siempre dieron lo mejor de sí mismos para que no falte nada, no solo a mí, sino también a mis hermanos. Sin el apoyo de mi familia nunca hubiera podido llegar a estas instancias de mi vida, y convertirme en la persona que soy.

También le agradezco a mi amiga y compañera de trabajo, Edith Guaytima, con quién comencé la aventura de realizar una tesis doctoral, y quién siempre estuvo en los buenos y malos momentos.

A mis tíos, primos y sobrinos que, a pesar de la distancia, siempre me brindaron su apoyo y cariño.

También a todas las personas que me brindaron su afecto y aliento durante todos estos años. Especialmente a mis profesoras Victoria y Rozet Salman, de quiénes aprendí, al igual que de la Dra. Márquez, que el esfuerzo y dedicación traen sus frutos.

Finalmente, le agradezco a mi novio Emmanuel Arias, cuyo amor, cariño, comprensión, paciencia y apoyo constante, me permitieron crecer y ser una mejor persona.

Los resultados presentados en esta tesis se encuentran parcialmente publicados en:

María Gabriela Márquez, Yamila Romina Brandán, Edith del Valle Guaytima, Carlos Humberto Paván, Nicolás Octavio Favale, Norma B. Sterin-Speziale: *Physiologically induced restructuring of focal adhesions causes mobilization of vinculin by a vesicular endocytic recycling pathway* . **Biochim. Biophys. Acta**, **1843** (2014) **2991–3003**.

| | |
|------------------|----------------------------------------------------------|
| AN | Apertura numérica |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BK | Bradiquinina |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| BSL-I | Lectina Griffonia Simplicifolia I |
| CDex | Metil- β -ciclodextrina |
| CERT | Proteína transportadora de ceramida |
| CF | Contacto focal / Contactos Focales |
| CK-7 | Citoqueratina-7 |
| D609 | Triciclododecan-9-yl-xantogenato |
| DBA | Lectina Dolichos Biflorus Agglutinin |
| DMEM/ F-12 | Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 |
| DRM | Membranas resistentes a detergentes |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FS | Fibra de estrés |
| FSD | Fibra de estrés dorsal |
| FSV | Fibra de estrés ventral |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| GTPasa | Guanosina trifosfatasa |
| kDA | KiloDalton |
| MDCK | Células Madin- Darby Canine Kidney |
| MEC | Matriz extracelular |
| MOC | Coefficiente de superposición de Manders |
| p125FAK | Quinasa del contacto focal |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PI4P | Fosfatidilinositol-4-fosfato |
| PI4P-5K | Fosfatidilinositol-4-fosfato-5 quinasa |
| PIP ₂ | Fosfatidilinositol-4,5-difosfato |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PMSF | Fenilmetilsulfonil fluoruro |
| PVDF | Polivinildifluoruro |
| RB2 | Receptor de bradiquinina tipo B2 |

| | |
|----------|-----------------------------------------|
| RE | Retículo endoplásmico |
| RTf | Receptor de transferrina |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| siRNA | ARN de interferencia pequeño |
| SM | Esfingomielina |
| SMnasa | Esfingomielinasa |
| SMS | Esfingomielina sintasa |
| SPN | Sobrenadante post-nuclear |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TBS | Buffer Tris salino |
| TC | Túbulo colector |
| TRITC | Isotiocianato de tetrametilrodamina |
| UA | Unión adherente / Uniones adherentes |
| Vh | Región cabeza de vinculina |
| Vt | Región cola de vinculina |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. EL TEJIDO RENAL | 3 |
| A- La papila renal | 3 |
| B- Túbulos colectores- Organización tisular | 4 |
| C- Diferenciación de las células epiteliales renales | 4 |
| 2. ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR | 6 |
| A- Estructuras de adhesión que median la unión célula-célula – Uniones adherentes | 6 |
| B- Estructuras de adhesión que median la unión célula-matriz extracelular. Contactos focales | 8 |
| C- Modulación de los contactos focales | 9 |
| D- Vinculina | 10 |
| E- Rol de la vinculina en las estructuras de adhesión | 10 |
| F- El citoesqueleto y su asociación con las estructuras de adhesión | 11 |
| 3. MEMBRANAS CELULARES-MEMBRANA PLASMÁTICA | 13 |
| A- Organización de los lípidos en las membranas | 14 |
| B- Composición lipídica – Esfingolípidos | 14 |
| C- Transporte intracelular de las membranas | 17 |
| D- El citoesqueleto y su participación en el transporte intracelular | 19 |
| 4. ELECCIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO | 20 |
| OBJETIVO | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 1- ANIMALES DE ESTUDIO | 23 |
| 2- OBTENCIÓN DE CORTES DE PAPILA RENAL Y FRACCIONAMIENTO CELULAR | 23 |
| 3- AISLAMIENTO DE VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA | 24 |
| 4- ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA | 25 |
| 5- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA MEMBRANA DE LAS VESÍCULAS | 25 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA DE LAS VESÍCULAS - ENSAYOS DE PARTICIÓN DE FASES CON TRITÓN X-114 | 25 |
| 7- ENSAYO DE PROTECCIÓN A LA ACCIÓN DE PROTEASAS | 26 |
| 8- ANÁLISIS DE LAS VESÍCULAS POR ESPECTROSCOPIA DE MASA (CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASA/ESPECTROMETRÍA DE MASA - LC-MS/MS LC-MS/MS) | 26 |
| 9- CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR DE PAPILA RENAL | 28 |
| 9.1 Inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa | 29 |
| 9.2 Silenciamiento génico de las isoformas de la esfingomielina sintasa | 30 |
| 9.3 Reversibilidad de la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa | 31 |
| 10- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR | 31 |
| 11- ENSAYOS DE WESTERN BLOT | 32 |
| 11.1-Proteínas asociadas a las vesículas que contienen vinculina | 32 |
| 11.2-Precipitación de proteínas según el método descrito por Crowell | 33 |
| 12- PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA | 34 |
| 13- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS IMÁGENES DE FLUORESCENCIA | 35 |
| 13.1- Colocalización de proteínas en las vesículas | 35 |
| 13.2- Recuento de contactos focales (CF) | 36 |
| 14- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS | 37 |
| 15. DISEÑO EXPERIMENTAL | 37 |
| ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA VINCULINA EN LOS TÚBULOS COLECTORES DE LA PAPILA RENAL | 37 |
| 15.1- Caracterización del modelo de estudio mediante el análisis de la expresión de proteínas marcadoras de tejido diferenciado | 37 |
| 15.2- Caracterización de las vesículas que contienen vinculina | 38 |
| 15.3- Análisis de la distribución de las vesículas que contienen vinculina -Planteamiento de un modelo de distribución intracelular en células de túbulo colector de la papila renal. | 38 |
| 15.4- Análisis de la participación de los microtúbulos en el transporte de las vesículas que contienen vinculina | 39 |
| 15.5- Análisis de la especificidad de BK en la inducción de vesículas que contienen vinculina | 39 |
| ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR EN EL TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL | 39 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 15.6- Estudio de la participación de la actividad de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de las estructuras de adhesión intercelular | 39 |
| 15.7- Estudio de la participación de la actividad de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de los contactos focales | 40 |
| 15.8- Análisis de la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa sobre el citoesqueleto de actina | 40 |
| 15.9- Estudio de la reversibilidad de los efectos producidos por la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa | 40 |
| RESULTADOS | 41 |
| ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA VINCULINA EN CELULAS DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL | 41 |
| 1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO | 41 |
| 1.1 Caracterización morfológica de las células de túbulo colector en cultivo primario | 42 |
| 1.2 Caracterización fenotípica de las células de túbulo colector en cultivo primario | 43 |
| 1.2 a) Caracterización de las células de túbulo colector mediante la unión de lectinas específicas | 43 |
| 1.2 b) Análisis de la presencia del cilio primario | 44 |
| 2. EFECTO DE LA BRADIQUININA SOBRE LOS CONTACTOS FOCALES EN CÉLULAS DE TUBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL | 46 |
| 3. ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA EN CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL | 48 |
| 3.1 Aislamiento de las vesículas que contienen vinculina | 48 |
| 3.2 Análisis morfológico de las vesículas por microscopía electrónica | 50 |
| 3.3- Estudio de la orientación de la vinculina en la membrana de las vesículas | 51 |
| 3.4 Estudio de la naturaleza de asociación de vinculina con la membrana de las vesículas | 52 |
| 3.5- Caracterización bioquímica de las vesículas que contienen vinculina | 54 |
| 3.5-a) Análisis de la presencia de marcadores del compartimento endosomal de reciclaje | 54 |
| 3.5-b) Análisis de la presencia de proteínas de los contactos focales en las vesículas aisladas | 55 |
| 3.5 -c) Caracterización de las vesículas mediante espectrometría de masa | 56 |
| 4. ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE DISTRIBUCIÓN DE LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA | 60 |
| 5. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS EN EL TRANSPORTE DE LAS VESÍCULAS | 68 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6. ANALISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE BK EN LA INDUCCIÓN DE VESÍCULAS CONTENIENDO VINCULINA | 69 |
| PARTICIPACIÓN DE LA VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN DE LAS CELULAR DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL | 73 |
| 1. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN ESFINGOMIELINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA | 73 |
| 1.1 Efecto de la inhibición farmacológica de las esfingomielina sintasas (SMSs) sobre las uniones adherentes | 73 |
| 1.2 Efecto del silenciamiento génico de la SMS1 y SMS2 sobre las uniones adherentes | 75 |
| 1.3- Efecto de la inhibición de la actividad de las SMSs sobre las proteínas que forman parte de las uniones adherentes | 78 |
| 2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN ESFINGOMIELINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULA-MATRIZ EXTRACELULAR | 80 |
| 2.1 Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre los contactos focales | 80 |
| 2.2 Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre el citoesqueleto de actina | 83 |
| 3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS SMSs | 84 |
| CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN | 89 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 106 |

RESUMEN

Los túbulos colectores (TC) renales están formados por un epitelio simple, y su organización tisular y función requieren de la presencia de estructuras de adhesión celular, como son los contactos focales (CF) y las uniones adherentes (UA), que conectan el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular, o con los complejos de unión célula-célula, respectivamente. Esta conexión se establece básicamente debido a la presencia de vinculina, molécula que posee sitios de unión a lípidos de membrana, a actina y a proteínas que forman parte de ambas estructuras de adhesión celular. En trabajos previos realizados con células de TC de papila renal, se demostró que la hormona bradiquinina (BK) provoca una reestructuración reversible de los CF, induciendo la movilización de vinculina, con la aparición simultánea en el citosol de vesículas conteniendo esta proteína. Estos trabajos pioneros sirvieron de base para la realización del presente trabajo de tesis.

Se eligió como modelo de estudio cultivos primarios de células de TC de papila renal de ratas adultas. Se observó que estas células conservan *in vitro* las características típicas de las células de TC en el tejido intacto. Este comportamiento se vio reflejado por el crecimiento en monocapas, la expresión de los glicoconjugados (DBA+) característicos de este tipo celular, filamentos intermedios constituidos por citoqueratina-7, la formación de UA y el desarrollo de un cilio primario.

En la primera parte de la tesis se realizaron estudios bioquímicos y morfológicos de las vesículas que contienen vinculina. Para ello, se utilizaron muestras enriquecidas en vesículas obtenidas de cortes delgados de papila renal, estimulados con BK. Para el aislamiento de las vesículas se puso en práctica un método inmunomagnético, utilizando un anticuerpo dirigido contra vinculina. Se demostró que la vinculina se asocia de forma periférica a la membrana de las vesículas, orientada hacia el citosol, a través de interacciones electrostáticas. El análisis por Western Blot y espectrometría de masa demostró que contienen, además de vinculina, PI(4,5)P₂, componentes del retículo endoplasmático (RE) y del citoesqueleto, y marcadores del compartimiento endosomal de reciclaje (Rab 5, Rab 11 y el receptor de transferrina), poniendo en evidencia la heterogeneidad de las mismas. Sobre la base de los resultados obtenidos, se propuso un modelo dinámico de distribución intracelular de vinculina. Es sabido que cuando no forma parte de las estructuras de adhesión, la vinculina conforma un pool citosólico. Los resultados obtenidos demostraron que, además de una forma libre, la vinculina también presenta una forma asociada a vesículas. Se planteó la existencia de dos poblaciones de vesículas: una localizada muy cerca del núcleo cuya función sería de reservorio, denominada *circuito de tránsito restringido* de vesículas entre el RE y el aparato de Golgi; y otra localizada en la zona marginal de la célula, que representa un *circuito corto de reciclaje* de endosomas

tempranos, los que participarían del recambio basal de la vinculina asociada a los CF. Cuando se estimulan las células con BK, ocurren dos fenómenos. Por un lado, vinculina se disipa de los CF, la que es captada por las vesículas Rab 5+ preexistentes, que forman parte del circuito corto de reciclaje localizado en la región marginal, y a tiempos prolongados de estimulación, estas vesículas adquieren Rab 11. Esto indica que la estimulación con BK promueve una movilización de vesículas del reservorio, desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, para lograr reestablecer las condiciones basales. Además, se demostró que los microtúbulos participan en el transporte de las vesículas que contienen vinculina. Por lo tanto, BK induce una reestructuración reversible de los CF y no su desarmado.

Trabajos previos demostraron que las proteínas que forman parte de los CF y UA, entre ellas vinculina, se localizan en microdominios rafts enriquecidos en colesterol y esfingomielina (SM). En la segunda parte de la tesis se estudió la participación de vinculina en el mantenimiento de las estructuras de adhesión celular. Para ello, las células de TC fueron incubadas en presencia de un inhibidor farmacológico, o transfectadas con un ARN de interferencia específico para las enzimas SM sintasa 1 y 2, presentes en el aparato de Golgi y membrana plasmática respectivamente, con el objetivo de disminuir su expresión. Solo la inhibición de la SM sintasa 1 produjo un deterioro de las UA, provocando la pérdida de unión entre las células. Paralelamente, se observó un incremento de la cantidad de CF que contenía vinculina, pero no talina. Puesto que la SM sintasa 1 se localiza en el aparato de Golgi, y su actividad es esencial para la formación de vesículas, el deterioro observado sobre las UA podría deberse a modificaciones en la formación de vesículas que participan en el proceso de transporte y reciclado de los complejos adherentes. Mientras que el aumento de los CF cumpliría un mecanismo compensatorio de las células ante la disolución de las uniones intercelulares, con el fin de mantenerse adheridas a la matriz extracelular, y de esta forma asegurar su supervivencia.

En conclusión, los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral aportan nuevas evidencias experimentales que resaltan la participación de la molécula de vinculina en los mecanismos que regulan la plasticidad celular, como lo es la pérdida o mantenimiento de estructuras de adhesión, para responder a cambios que se producen en su entorno sin perder la viabilidad.

INTRODUCCIÓN

1. EL TEJIDO RENAL

Los riñones son los órganos más importantes del sistema urinario, se encargan de la filtración, absorción y reabsorción del agua, sales e iones que llegan para la producción de orina. Son órganos pares que se encuentran localizados a ambos lados de la columna vertebral. Cada riñón se encuentra envuelto en una cápsula fibrosa, debajo de la cual el tejido se divide en una región externa o córtex, y una región interna o médula. A su vez, el tejido renal se encuentra dividido en estructuras cónicas llamadas pirámides renales. La base de cada pirámide se denomina papila, y es la región que envía la orina formada a los cálices, quienes desembocan en los uréteres, que finalmente depositan la orina en la vejiga. Para cumplir con su función de formar la orina, los riñones están constituidos por sistemas de túbulos especializados que se encuentran interconectados [1, 2].

A- La papila renal

En todos los mamíferos los riñones cumplen la misma función, pero presentan diferencias morfológicas. Los riñones de los humanos son multilobulados por lo que tienen un número de papilas variables, entre 4-18 por riñón. Mientras que otros mamíferos como la ratas y el ratón presentan una sola papila en su estructura renal unilobular [3] (Figura 1A)

La región de la papila está constituida por: a) los túbulos colectores, que son de gran tamaño y participan en la etapa final de la formación de la orina; b) asas delgadas de Henle, que son escasas; c) numerosos vasos rectos; y d) el intersticio, cuyo tamaño e importancia aumentan al ir acercándose al extremo de la papila. Este intersticio se encuentra formado por gran cantidad de material laxo, claro y acelular, como fibras de colágeno, pequeñas gotas de lípidos y materiales similares a la lámina basal. También contiene células intersticiales, como fibroblastos, de contorno irregular y prolongaciones citoplasmáticas estrechas y estrelladas que se extienden en todas direcciones. El intersticio cumple un papel importante en la homeostasia de sales y agua necesaria para la formación de la orina [1, 2].

B- Túbulos colectores- Organización tisular

La unidad funcional renal está conformada por el nefrón o nefrona y los túbulos colectores correspondientes (Figura 1B), los que junto con el tejido conectivo intersticial en el que transcurren vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, representan el parénquima renal. Los túbulos colectores comienzan en la corteza y se dirigen hacia la médula por los rayos medulares, y en la porción más interna de la médula o papila se fusionan con otros túbulos colectores para formar el conducto papilar (Figura 1B). A su vez, los túbulos colectores están formados por dos tipos celulares, las *células principales* (células claras) que aparecen en mayor número, y las *células intercalares* (células oscuras), que disminuyen en número hacia la médula y desaparecen por completo en la zona de la papila. Asimismo, la concentración de la orina tiene lugar en los túbulos colectores, dado que allí la permeabilidad al agua es muy elevada como consecuencia de la presencia de acuaporina 2 en las células principales, cuya expresión está regulada por la hormona antidiurética [1, 2].

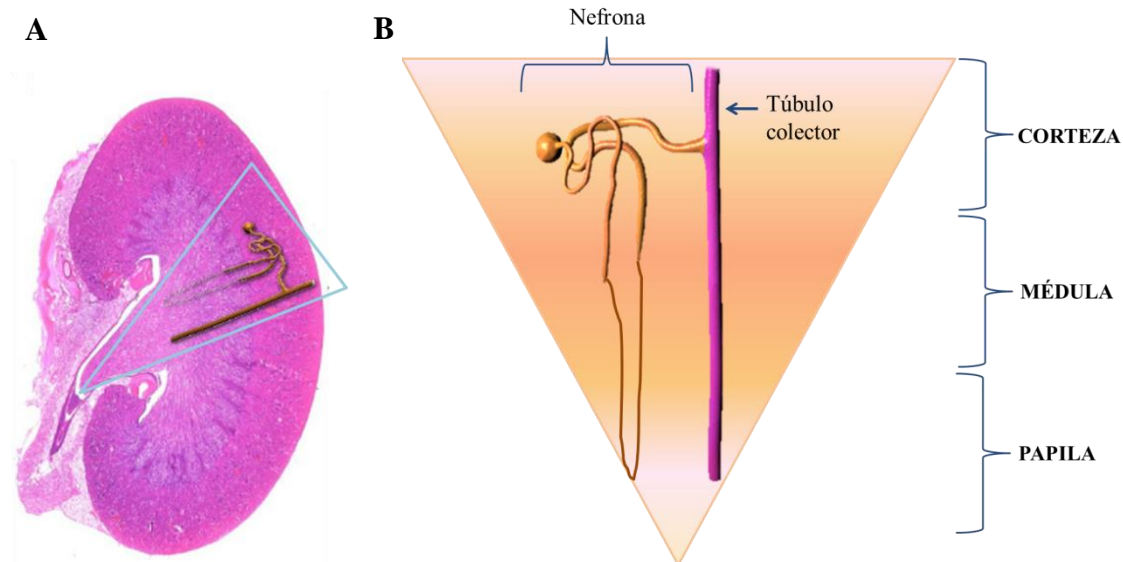


Figura 1. (A) Imagen de un riñón unilobular de rata coloreado con Hematoxilina y Eosina. (B) Esquema que representa la organización piramidal del tejido renal. En la parte superior se encuentra la corteza donde se localiza la nefrona o nefrón y también túbulos colectores. Se continúa con la médula renal y finalmente en la base de la pirámide se encuentra la papila, constituida por túbulos colectores, asas delgadas de Henle e intersticio renal.

C- Diferenciación de las células epiteliales renales

El epitelio de los túbulos renales se encuentra formado por una sola capa de células, denominado epitelio simple (Figura 2B). La diferenciación de las células epiteliales se inicia con la polarización apico-basal y la expresión asimétrica de las proteínas y lípidos de

membrana. El primer proceso se debe a la delineación de dos dominios de membrana diferentes, llamados apical (que se dirige hacia la luz) y basolateral (en contacto con la matriz extracelular), separados por uniones estrechas [4]. El segundo proceso se debe a la distribución asimétrica de las proteínas y los lípidos en los dominios de membrana correspondientes. Como las superficies apical y basolateral tienen distintas funciones, su composición proteica y lipídica debe ser diferente (Figura 2A). Esta polaridad apical – basolateral resulta crucial para la función de los epitelios de transporte, como los presentes en el riñón y en el hígado. Estos epitelios establecen barreras de permeabilidad entre distintos compartimentos, y el transporte vectorial a lo largo del eje apical-basal es el que permite el mantenimiento de la homeostasis iónica. Para crear esta asimetría, las proteínas de membrana y de secreción son dirigidas a regiones específicas de la membrana plasmática, definiendo y manteniendo su identidad y funciones únicas [5]. Para establecer la polaridad celular, los tejidos epiteliales requieren señales externas mediadas por la interacción de las células con el medio, con otras células y/o con la matriz extracelular [6, 7].

El estadio final del proceso de diferenciación de la mayoría de las células epiteliales, y en particular, de las células de los túbulos colectores renales, consiste en el desarrollo de un cilio primario desde la superficie apical [8]. Se trata de una estructura similar a un cabello, que se extiende desde el centro de la membrana apical de las células epiteliales [9, 10] (Figura 2A). La ciliogénesis es iniciada desde el centríolo subapical que forma el cuerpo basal, generando un axonema compuesto por microtúbulos y proteínas asociadas. El cilio está rodeado por una membrana que es continua con la membrana apical, pero que presenta una composición diferente [11]. A diferencia de otras organelas, el cilio se ensambla únicamente cuando las células abandonan el ciclo celular para ingresar a un estado de quiescencia, como sucede en las células diferenciadas [12]

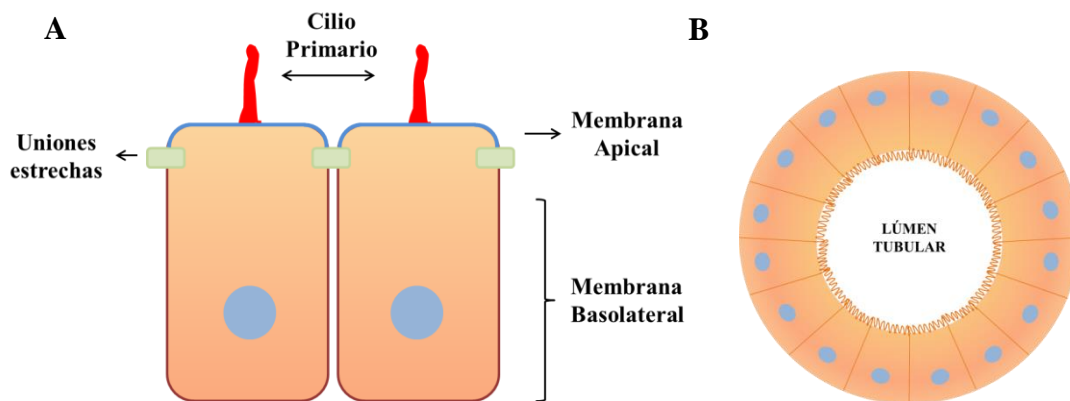


Figura 2. (A) Esquema de células polarizadas. Se representan los diferentes dominios de membrana: apical en color azul, basolateral en marrón y el cilio primario, cuya composición es diferente a la de la membrana apical, en color rojo. Las uniones estrechas establecen el límite entre los dominios apical y basolateral. (B) Las células polarizadas en los túbulos colectores forman un epitelio simple en donde la región apical se orienta al lumen del túbulo y el dominio basolateral está en contacto con la matriz extracelular.

2. ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR

El establecimiento de las estructuras de adhesión celular constituye una etapa fundamental en el proceso de organización tisular. La adhesión célula-matriz a través de la formación de *contactos focales* (CF) precede a la unión célula-célula representada básicamente por las *uniones adherentes* (UA).

A- Estructuras de adhesión que median la unión célula-célula –

Uniones adherentes

Las UA se caracterizan por la formación del complejo E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina, que permite que la unión célula-célula interaccione con el subyacente citoesqueleto de actina [13, 14, 15, 16]. Por lo que, la correcta distribución de E-cadherina resulta fundamental en la adquisición y en el mantenimiento de la estructura y polarización de la célula epitelial [17, 18], como así también, de la arquitectura tisular [19, 20]. La E-cadherina es el miembro mejor estudiado de la familia de cadherinas y se expresa en células de estirpe epitelial [21]. La porción extracelular de las cadherinas consiste en 5 dominios que unen calcio, y establecen uniones homofílicas relativamente débiles con E-cadherinas de la célula vecina [21, 22]. La cola citoplasmática de aproximadamente 150 aminoácidos, altamente conservada entre los miembros de la familia, posee un sitio de unión para β -catenina o para γ -catenina o plakoglobina [23, 24]. La unión de una región particular de β -catenina con la cola citoplasmática de la cadherina es necesaria para el transporte vesicular de E-cadherina, recientemente sintetizada, hacia la membrana plasmática [25]. El dominio amino terminal de β -catenina o de γ -catenina se unen en forma directa con α -catenina [21, 22, 23]. α -Catenina puede unirse en forma directa a F-actina, o bien a través de α -actinina, ZO-1, formina y vinculina [26, 27]. De ésta manera, α -catenina conecta el complejo E-cadherina/ β -catenina con el citoesqueleto de actina [21]. Esto constituye un proceso crítico no solo para la estabilización de las uniones intercelulares, sino también, para coordinar la dinámica de la actina en las UA [14, 16, 28]. Los filamentos de actina de las uniones célula-célula son dinámicos y sufren un continuo recambio, y es muy probable que coexistan múltiples pools de F-actina con distinto grado de estabilidad [29, 30, 31, 32]. Estos filamentos son contráctiles debido a la presencia de miosina II, la cual modula la tensión y la estabilidad de los filamentos [30, 33, 34]. En las células epiteliales, este recambio de filamentos puede limitar la tensión contráctil que se genera en las uniones laterales situadas por debajo de las uniones adherentes [35, 36] (Figura 3B).

Las *uniones estrechas* se ubican en la porción más apical de las células, constituyen una barrera de permeabilidad transepitelial, y juegan un rol central en el establecimiento de la polaridad de las células epiteliales evitando la difusión de lípidos y proteínas integrales entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática (Figura 3B). Están constituidas por las proteínas ZO-1, claudina y ocludina [37]. Un tercer tipo de estructura de adhesión célula-célula,

los *desmosomas*, se ubican por debajo de las uniones adherentes, y se asocian con los filamentos intermedios [38]. Las uniones estrechas, las UA y los desmosomas generalmente se alinean en los epitelios simples en el orden mencionado. El conjunto de las tres estructuras descritas forman lo que se conoce como “*complejo de unión*”, y es poco lo que se sabe acerca del mecanismo o los factores que determinan el establecimiento polarizado de estas uniones. Hasta el momento, sólo se ha logrado determinar que el establecimiento de las UA es prerequisites para la formación de las uniones estrechas [37], e incluso para los desmosomas [39].

Mediante video microscopía de células que expresan GFP-actina o GFP-cadherina, estimuladas con calcio, se estudió el movimiento de las proteínas actina, cadherina, y catenina durante la formación de láminas de células epiteliales. Este proceso dinámico comienza cuando dos células se contactan y ocurre la unión de dos complejos E-cadherina/ β -catenina opuestos que se encuentran en el extremo de un filopodio o de un lamelipodio [28, 40]. El paso que limita la velocidad de la adhesión celular es la unión del complejo cadherina/catenina al citoesqueleto de actina cortical, hecho que provoca la acumulación y estabilización de las UA para formar “puntos” visibles por microscopía de fluorescencia [28, 40]. Después de la aparición inicial de estas UA primordiales, aparecen en la zona adyacente nuevos “puntos” generando una estructura tipo velcro, que luego se sella para formar las láminas epiteliales [28, 40]. En presencia de citocalasina-D - un potente inhibidor de la polimerización de actina - estos puntos no forman estructuras de tipo velcro, y aunque la E-cadherina se localiza en las membranas adyacentes, las láminas epiteliales no se establecen [28]. Cuando la UA madura, más moléculas de cadherina se concentran del lado opuesto de la membrana, y el movimiento del lamelipodio cesa una vez que se forma la adhesión estable entre las células [40]. Al mismo tiempo, los filamentos de actina en las UA maduras se reorganizan en haces lineales, no ramificados, paralelos a la membrana plasmática [28, 40]. α -Catenina participa en la remodelación local de actina mediante su unión a la proteína formina, induciendo la formación de filamentos lineales de actina [24, 41]. El reclutamiento de vinculina y su unión a α -catenina para formar parte de las UA ocurriría como consecuencia de la fosforilación mediada por PKC de los residuos serina y treonina presentes en la región de la cola (Vt) de vinculina [42, 43, 44]. Como se mencionó anteriormente, la formación de las UA es prerequisite para la formación de las uniones estrechas. Durante la formación del complejo de unión, E-cadherina, β -catenina, α -catenina, y ZO-1 se ensamblan inicialmente en los sitios de uniones primordiales, y posteriormente las proteínas claudina y ocludinas son reclutadas para formar las uniones estrechas [45]. Aún se desconoce el mecanismo por el cual las uniones estrechas y las UA se alinean desde la región apical hacia la región basal de la membrana plasmática lateral de las células polarizadas (Figura 3A).

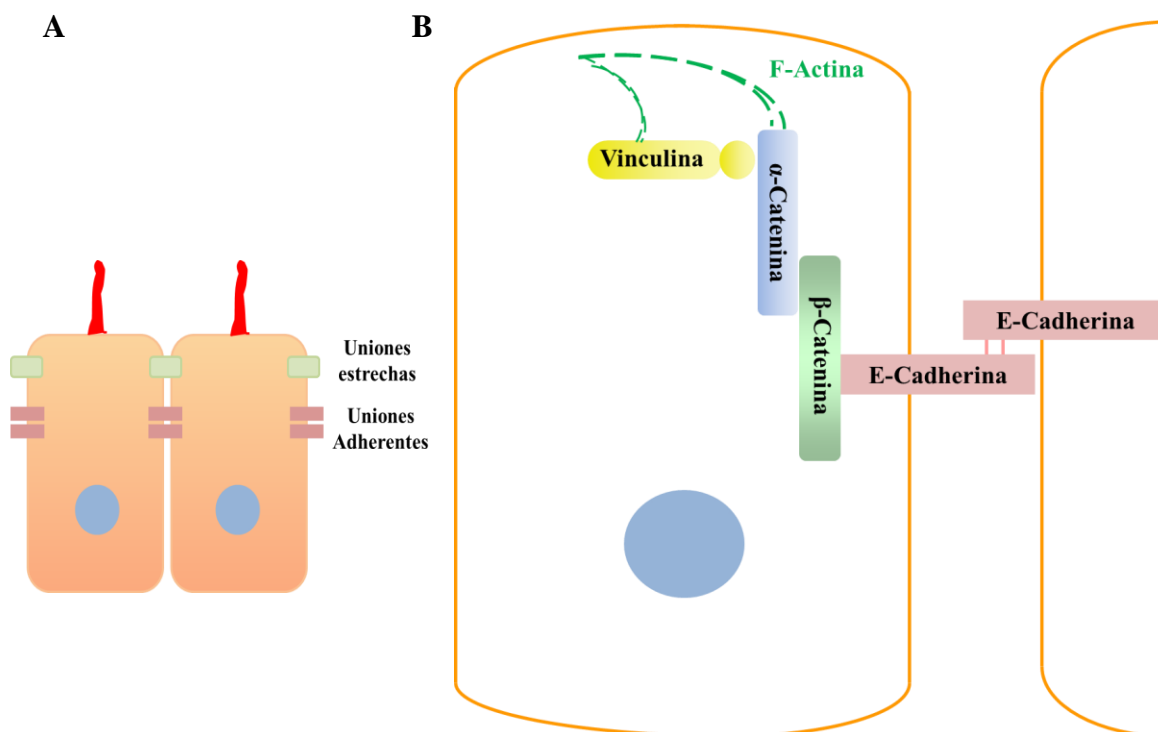


Figura 3. (A) Esquema que representa la alineación de las uniones estrechas y uniones adherentes en células polarizadas. **(B)** Esquema que muestra la organización de las proteínas que conforman la UA. E-cadherina atraviesa la membrana plasmática y se une a otra E-cadherina de una célula vecina. La unión de su dominio citosólico a β -catenina, α -catenina y vinculina permite la asociación con el citoesqueleto de actina.

B- Estructuras de adhesión que median la unión célula-matriz extracelular. Contactos focales

Los contactos focales (CF) son complejos multiproteicos que participan en la unión de las células con la matriz extracelular [46, 47]. Las proteínas transmembrana que median estas adhesiones son las *integrinas*, y lo hacen a través de la unión de su dominio extracelular a diferentes componentes de la matriz extracelular, y de la región citoplasmática de su cadena β con *talina*, la que además posee sitios de unión a otras proteínas del CF como *vinculina* [48, 49, 50]. Ambas proteínas poseen sitios de unión a *F-actina*, y así los CF conectan el citoesqueleto de actina (fibras de estrés) con la matriz extracelular [47, 51, 52, 53, 54] (Figura 4). Cuando no forma parte de las estructuras de adhesión celular, vinculina presenta una conformación cerrada por interacción intramolecular cabeza-cola (Vh-Vt), enmascarando los sitios de unión a talina, paxilina y actina [55, 56, 57] (Figura 4B). La activación de esta molécula requiere de la liberación de la interacción entre el dominio de la cabeza D1 (residuos 1-258) y Vt (residuos 896-1066), la cual puede ser inducida por diferentes ligandos. Uno de ellos es el

fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PI(4,5)P₂ o PIP₂) que activa vinculina interrumpiendo la interacción Vh-Vt cuando se une a una región rica en aminoácidos básicos presentes en la región Vt de la molécula [58]. Alternativamente, se ha planteado que la exposición de los sitios de unión a vinculina presentes en talina es suficiente para interrumpir la conformación autoinhibitoria Vh-Vt [54, 59, 60]. La activación y unión de talina a la integrina para iniciar la formación del complejo focal depende de la presencia en la membrana de *fosfatidilinositol-4-fosfato* (PI4P) [61]. Talina porta a la enzima PI4P-5K tipo I γ y promueve la síntesis local de PIP₂, que recluta a vinculina al complejo focal [62, 63]. También se ha propuesto que la unión de PIP₂ a vinculina no sería esencial para su activación y reclutamiento, pero si necesaria para desacoplar los CF del citoesqueleto de actina, actuando la vinculina como un sensor lipídico en la regulación del recambio de estos sitios de adhesión [64, 65]. Trabajos más recientes demuestran que PIP₂ y actina pueden unirse simultáneamente a vinculina y mediar su oligomerización, y esta unión sería necesaria para el funcionamiento de los CF [53, 66, 67].

C- Modulación de los contactos focales

Los CF son estructuras dinámicas que se encuentran en reestructuración constante [46, 50, 52]. Los cambios dinámicos en la interacción de la célula con la matriz extracelular que la rodea son de importancia fundamental para numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la determinación de la forma y proliferación celular, la migración, remodelación de tejidos y diferenciación durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y en el mantenimiento de la integridad tisular [46, 50, 52, 68]. También subyace a la progresión de un amplio espectro de patologías, incluyendo la metástasis de células cancerosas, la aterosclerosis, y la hipertrofia cardíaca, así como desordenes de tipo fibróticos y neurodegenerativos [50]. Trabajos realizados con células migratorias han demostrado que el desarmado de los CF no consiste en el mecanismo inverso del armado, sino que ocurriría por un mecanismo de endo/exocitosis de la integrina mediado por miembros de la familia de Rab GTPasas (Rab 21), en el cuál también estarían implicados los microtúbulos, dinamina y p125^{FAK} [69, 70, 71, 72]. También se ha descrito en células migratorias que la vida media de integrina en los CF depende del tamaño de estos complejos proteicos, y puede variar de algunos segundos hasta largos períodos de tiempo [73, 74]. Además, se estableció que la unión de vinculina a talina refuerza y estabiliza al complejo focal en formación, lo que reduce el reciclado de integrina y favorece el consiguiente crecimiento de los CF [60].

En los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha estudiado el rol que ejerce la bradiquinina (BK) sobre los CF [75]. La BK es una hormona intrarrenal que posee una importante función como modulador vasoactivo del riñón. El receptor de BK de tipo B2 se halla presente en varios tipos celulares del riñón, tales como las células de túbulo colector, mesangiales e intersticiales [76]. La BK induce la hidrólisis de PIP₂ mediante la activación de la PLC [76], y tanto la PLC como el receptor de BK B2 se localizan en microdominios raft [77, 78]. La BK también

estimula la fosforilación en tirosina de proteínas que forman parte del CF como lo son la paxilina y p125^{FAK} [79]. Utilizando como modelo experimental cultivos primarios de células de túbulo colector de papila renal se demostró que la BK modula los CF al inducir una reestructuración de los mismos de manera reversible, movilizandovinculina -pero no talina- por un mecanismo dependiente de la PLC β , lo que provoca además cambios en el citoesqueleto de actina. Las células permanecen unidas a la matriz extracelular, por lo tanto, la acción de BK no promueve el desarmado de los CF, sino su reestructuración. Por lo tanto, se propuso este hallazgo como un nuevo mecanismo por el cual la BK modula la función de los túbulos colectores de la papila renal [75].

D- Vinculina

La organización tisular de los túbulos colectores renales requiere en primer término la adhesión de las células a la matriz extracelular mediante la formación de los CF, con posterior establecimiento de las UA. Un componente común a ambas estructuras de adhesión es la molécula de vinculina [47, 51, 80]. La vinculina es una proteína citoplasmática de 116 kDa, que no posee actividad enzimática. Su función se rige por las interacciones proteína-proteína que están altamente reguladas por cambios conformacionales. Además de su muy conocido rol en el establecimiento de la adhesión célula-matriz, la vinculina está emergiendo como un regulador funcional de la unión célula-célula mediada por cadherinas. La vinculina se expresa en la mayoría de los tipos celulares y tejidos, y posee un rol fundamental en la motilidad celular y en la supervivencia evitando la “anoikis”, que es la muerte celular por apoptosis cuando la célula epitelial pierde contacto con la matriz extracelular [81]. Se ha descrito la existencia de un pool de vinculina citosólico, y un pool que forma parte de las estructuras de adhesión celular [82] (Figura 4B). Estudios *in vivo* ilustran su rol vital en la embriogénesis y en situaciones patológicas [83], pero también demuestran que el modelo de reclutamiento y activación de vinculina no es tan simple como se plantea [84]. Las células que carecen del gen de vinculina, como las células F9, presentan inconvenientes en la organización del complejo de unión [26]. En ratones, es esencial para el desarrollo embrionario de cerebro y corazón, y los embriones homocigota (vin $-/-$) mueren al día 10 de gestación [85]. La disrupción de vinculina ocurre en algunos estados de enfermedad. Por ejemplo la pérdida de expresión de vinculina es común en algunos tipos de procesos cancerosos [86, 87], y su mutación está ligada a la generación de cardiomiopatías [88, 89].

E- Rol de la vinculina en las estructuras de adhesión

El reclutamiento de vinculina, tanto en los CF como en las UA, es un mecanismo conservado y cumple un papel importante en la percepción/detección mecánica de estas estructuras del medio

que las rodea. E incluso, el reclutamiento de vinculina lleva al mismo refuerzo de adherencia en ambos tipos de uniones [90]. Esto se debe a que vinculina se une de forma directa a actina mediante dos mecanismos: a) a través de la región de su cola recluta monómeros de actina-G, que nuclea la polimerización de los filamentos; y, b) uniéndose a filamentos de actina existentes, promoviendo la modificación de su estructura [91].

En el caso particular de los CF, se han reportado dos posibles mecanismos mediante los cuales vinculina promueve la unión del citoesqueleto de actina a los CF nacientes: 1) por si misma promoviendo la formación de los filamentos; o 2) reclutando el complejo Arp2/3 para nuclear la formación de los filamentos. El primer mecanismo se presenta cuando las condiciones fisiológicas le indican a la célula la necesidad de formar grupos de filamentos de actina, mientras que el segundo responde a la necesidad de formar redes de filamentos especializadas como los que forman parte de los lamelipodios [92].

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se observó que la hormona BK provoca una remodelación del citoesqueleto de actina en células de túbulo colector de papila renal [75]. En las células de túbulo colector sin tratar, el citoesqueleto de actina se organiza en forma de *fibras de estrés ventrales*, que son cortas y se asocian a CF en ambos extremos. Está descrito que este tipo de fibras de estrés cumplen un papel importante en la adhesión de las células a la matriz extracelular [93]. Luego del agregado de BK, los filamentos de actina se organizaron en forma de *fibras de estrés dorsales*, que a diferencia de las primeras, son largas, y se asocian a CF en uno solo de sus extremos. Las fibras de estrés dorsales pueden actuar como plataformas para la formación de nuevas fibras de estrés ventrales, retornando a las células a su estado inicial [75]. Estos resultados concuerdan con los datos aportados por otros autores, en los cuales proponen que la presencia de vinculina cumple un rol importante en el mantenimiento y unión de los CF con el citoesqueleto de actina, y de este modo participa en la transmisión de señales [60, 94]

F- El citoesqueleto y su asociación con las estructuras de adhesión

La capacidad que poseen las células eucariontes de adoptar distintas formas, de interactuar mecánicamente con el medio extracelular, y de organizar sus componentes internos, depende del citoesqueleto. El citoesqueleto comprende una red compleja de tres tipos de filamentos proteicos que se extienden por toda la célula: *filamentos intermedios*, *microfilamentos* o *filamentos de actina*, y *microtúbulos*.

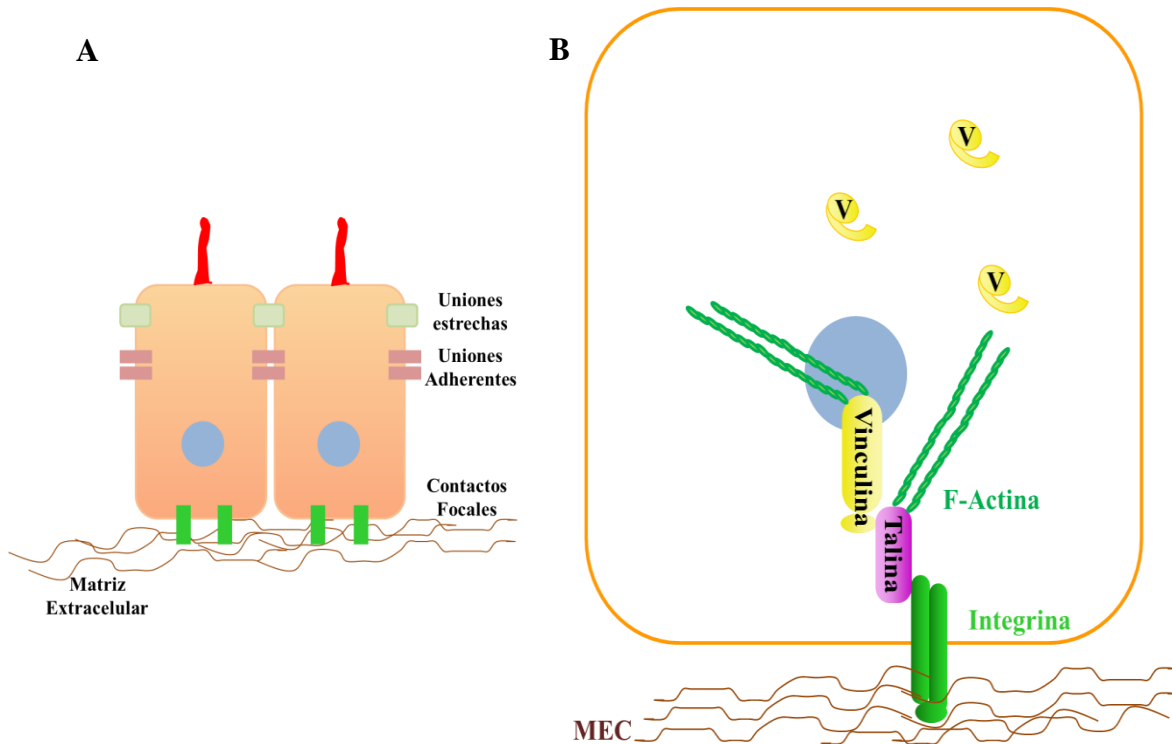


Figura 4. (A) Esquema que representa la localización de los CF en la membrana basal de las células. (B) El esquema muestra la organización de las proteínas que forman los CF. La integrina atraviesa la membrana plasmática y en el dominio extracelular se asocia proteínas de la matriz extracelular y en la porción citosólica se une a talina, la cual se une a filamentos de actina y a vinculina. Vinculina también se asocia a los filamentos de actina, que se organizan como fibras de estrés. Cuando no está formando parte de las estructuras de adhesión, vinculina adopta una conformación citosólica cerrada y autoinhibida.

Los *filamentos intermedios* son los más estables, y la dinámica de su remodelación es del orden de horas [95]. Son los encargados de conferir resistencia mecánica a las células para evitar deformaciones [96]. En las células epiteliales, el principal componente es la queratina que se asocian a los complejos proteicos que conforman los desmosomas y median estructuras de unión entre las células [97].

Los *microfilamentos* o *filamentos de actina* son estructuras helicoidales, y se encuentran en todas las células y son esenciales para la movilidad y el mantenimiento de la forma celular. Dependiendo del tipo de proteínas fijadoras de actina con las que se asocian, los filamentos de actina pueden originar estructuras permanentes como las microvellosidades, o pequeños haces contráctiles o fibras de estrés (FS) del citoplasma, proyecciones laminares (lamelipodios) o digitiformes (filopodios) del borde activo de células en movimiento, o el anillo contráctil durante la división celular. Las FS se componen de filamentos de actina en un número que varía de 10 a 30. Estos haces se entrecruzan por acción de la proteína α -actinina, y también pueden

asociarse con miosinas II, lo cual les otorga la capacidad de ser contráctiles [98]. Existe una clasificación de las FS propuesta por Small, que dependiendo si se asocian o no con los CF por uno o ambos extremos, se los denomina *FS dorsales o ventrales*, respectivamente [99]. Las FS dorsales no contienen miosina II, por lo tanto, no son contráctiles [100]. Este tipo de FS posiblemente funcionen como plataforma para el ensamblado de otras FS [93, 100]. Las FS ventrales contienen miosina, por lo que son contráctiles, y por lo tanto, representan la mayor maquinaria contráctil en muchos tipos celulares [99]. Las FS ventrales pueden formarse a partir de FS dorsales preexistentes debido a la reorganización de su estructura [93]. Existe un tercer tipo, los *arcos transversales*, que a diferencia de los mencionados, no se asocia con los CF [93, 99]. Están formados por filamentos de actina curvos, que presentan un patrón de distribución periódico de α -actinina, y miosina II lo que les permite contraerse. Si bien los arcos transversales no se asocian a los CF, si lo hacen con otras FS para transmitir de esta forma fuerza a la totalidad de la célula [93, 99].

En las uniones adherentes, los *filamentos de actina* se organizan en forma de haces lineales, no ramificados, paralelos a la membrana plasmática, que no constituyen FS [28, 40]. Esta estructura recibe el nombre de *cinturón circunferencial* y participa en el mantenimiento de la forma columnar de las células epiteliales como así también en la integridad mecánica del tejido [101].

Por último, los *microtúbulos*, se encuentran formados por subunidades de α - y β -tubulina y su dinámica de polimerización cumple funciones importantes durante el proceso de división celular, como así también durante la interfase [95]. En las UA de células MDCK diferenciadas, los microtúbulos presentan una organización apico-basal, con su extremo de mayor crecimiento y dinamismo orientado hacia la región basal [102]. Se ha demostrado que los agentes que afectan la estabilidad de los microtúbulos, como nocodazol, son capaces de alterar a las UA, lo que refleja la importancia de los microtúbulos en el mantenimiento de las UA [103]. En células migratorias, la unión de los microtúbulos a los CF se ha relacionado con el proceso de desarmado de los mismos al promover la endocitosis de las integrinas [71]. Tanto los filamentos de actina como los microtúbulos son estructuras con polaridad, cuya dinámica de remodelación es del orden de minutos [95].

3. MEMBRANAS CELULARES-MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática es la estructura que define a las células y separa el contenido del interior con el exterior. Todas las membranas biológicas presentan la misma arquitectura básica: una bicapa de fosfolípidos en la cual se encuentran incluidas proteínas. La composición lipídica actúa como una barrera de permeabilidad que ayuda a mantener las diferencias entre el lado interno y externo de las células; y a su vez, las proteínas que se allí localizan dotan a la membrana con funciones específicas. En las membranas de las células eucariontes, existen tres

clases principales de lípidos: glicerolípidos, esfingolípidos y esteroides, cuyas propiedades bioquímicas y biofísicas impactan sobre la función de las membranas.

A- Organización de los lípidos en las membranas

Los lípidos en las membranas no se encuentran distribuidos al azar en las bicapas, sino que conforman *dominios*, que pueden alcanzar múltiples formas y abarcar diferentes tamaños. Ejemplos de dominios de gran escala son los dominios apical, basolateral e incluso el del cilio en las membranas de células epiteliales [104]. Un ejemplo muy estudiado son los *rafts*. Los *raft* son microdominios de membrana (10-200 nm) enriquecidos en colesterol y esfingolípidos que pueden moverse lateralmente dentro de la membrana, y compartimentalizan procesos celulares, como por ejemplo transducción de señales [77, 78, 105, 106]. Debido a sus características fisicoquímicas, los esfingolípidos pueden formar dominios de membrana más ordenados, rígidos y de mayor espesor, en el cual se insertan preferentemente algunas proteínas, dando origen a distintos dominios especializados de membrana. Esta dinámica de organización puede ser utilizada para clasificar proteínas durante el transporte vesicular o como plataforma de reclutamiento de proteínas en la membrana plasmática [107, 108, 109]. Los *rafts* son insolubles en detergente no-iónico en frío, motivo por el cual también se los denomina *DRM* (*detergent-resistant microdomains*), y ésta característica es la que permite su aislamiento [105, 106].

Las uniones estrechas se ubican en microdominios de membrana resistentes a detergentes no iónicos [37]. También se ha descrito en células epiteliales y en mioblastos, la presencia de proteínas de la familia de las cadherinas, β -catenina y plakoglobina en fracciones insolubles en detergente [110, 111, 112]. En trabajos realizados en nuestro laboratorio utilizando cultivos primarios de células de túbulo colector de papila renal, se demostró que tanto las proteínas que forman parte de los CF, como lo son vinculina y talina, como las que participan en la formación de las UA, se localizan en dominios específicos de membrana (DRM) enriquecidos en colesterol y esfingomielina (Figura 5) [113, 114, 115].

B- Composición lipídica – Esfingolípidos

Las especies lipídicas que forman los dominios de membranas son esenciales para el mantenimiento de las funciones de la misma. Como se mencionó, los *rafts* se encuentran enriquecidos en colesterol y esfingolípidos [77, 78, 105, 106]. Los esfingolípidos se encuentran formados por una base esfingoidea de cadena larga. Las bases más comunes son esfinganina y esfingosina, las cuales difieren en que la última contiene un doble enlace *trans* en posición 4-5, que es esencial para algunas de las funciones biológicas en las que los esfingolípidos están involucrados. La ceramida es el esfingolípidido más simple y constituye el esqueleto de todos los esfingolípidos complejos. En la ceramida la base esfingoidea se encuentra unida a un ácido

graso. Los ácidos grasos de los esfingolípidos son saturados y varían en su longitud, aunque también pueden encontrarse ácidos grasos monoinsaturados, de cadena muy larga [116]. La unión de ceramida, cuya síntesis ocurre en el retículo endoplásmico (RE), a fosforilcolina, proveniente de fosfatidilcolina, forma esfingomielina (SM).

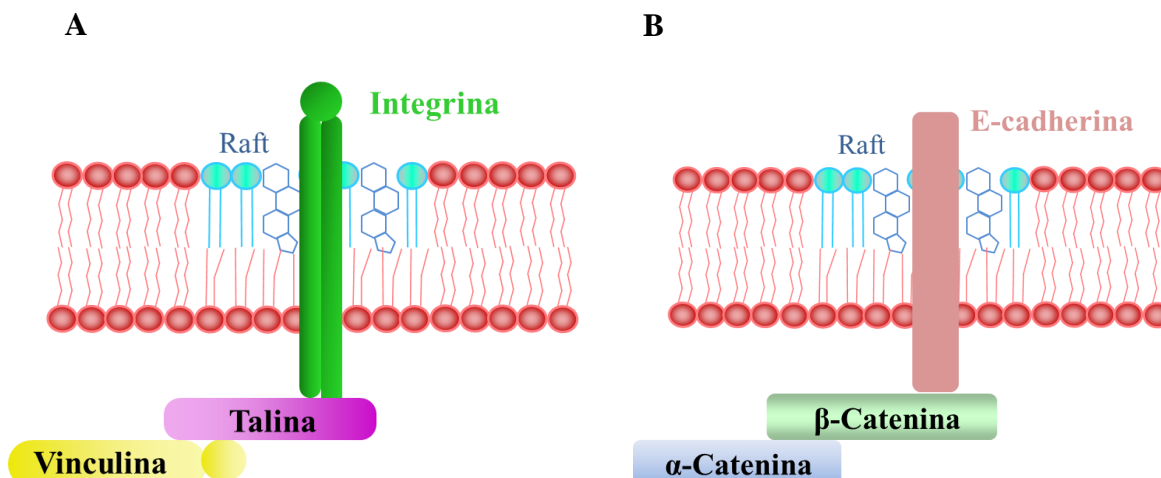


Figura 5. Esquema que representa las proteínas que forman parte de los CF en (A) y de las uniones adherentes en (B), y su localización en microdominios de membrana *rafts*, en células de túbulo colector de la papila renal.

Se han descrito dos vías de síntesis de esfingolípidos: la *síntesis de novo* y la *vía de salvataje* (Figura 6). La *síntesis de novo* de SM a partir de ceramida ocurre en la cara luminal del aparato de Golgi [117], por la transferencia de fosforilcolina desde fosfatidilcolina a la ceramida. Recientemente han sido identificadas dos *esfingomielina sintasas* (SMSs): la SMS1, localizada en el aparato de Golgi, y la SMS2 en la membrana plasmática [117, 118, 119]. Dado que la ceramida es sintetizada en el RE, debe ser transportada al aparato de Golgi para su posterior transformación en SM. Si bien se sabe que la ceramida puede seguir este camino por vía vesicular, se ha descrito que la ceramida responsable de la síntesis de SM es transportada por la proteína transportadora CERT [120]. Luego de su síntesis en el aparato de Golgi, la SM llega a la membrana plasmática por transporte vesicular. La SMS es la última enzima que participa en la *síntesis de novo* de SM [121]. La localización y actividad de estas enzimas enriquecen de SM a las membranas del trans Golgi, la membrana plasmática e incluso al compartimento de reciclaje endosomal [122].

La *vía de salvataje* se produce por la degradación constitutiva de los esfingolípidos y glucoesfingolípidos, que ocurre en los compartimientos subcelulares ácidos: los endosomas

tardíos y los lisosomas (Figura 6). La SM es convertida en ceramida por acción de la esfingomielinasa ácida, la cual puede ser posteriormente hidrolizada por la ceramidasa ácida a esfingosina (Sph) y ácido graso libre, y ambos pueden ser liberados del lisosoma [123, 124], a diferencia de la ceramida que por su característica hidrófoba no tiene esta capacidad [125]. De esta forma, la esfingosina puede re-entrar a la vía de síntesis formando ceramida nuevamente en el RE [126].

En las células de estirpe epitelial, el transporte de esfingolípidos es de fundamental importancia, ya que en estas células, puede definir a la membrana apical enriquecida en glucosilceramida y la basolateral enriquecida en SM [127].

Es sabido que la regulación de la función de las proteínas de membrana por sus lípidos constituyentes puede ocurrir a través de interacciones químicas específicas entre la proteína y un lípido individual [128], como ocurre con vinculina y el PIP₂ [129], o por interacciones inespecíficas entre la proteína y el comportamiento de la bicapa como una macroestructura con propiedades físicas colectivas (por ej. grosor, curvatura intrínseca, elasticidad, etc.) [130, 131]. Pero también se ha establecido que cambios locales en la composición fosfolipídica en determinadas zonas de la membrana regulan procesos fisiológicos, como por ejemplo la citocinesis [132]. En trabajos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la composición lipídica de los microdominios DRM aislados de células de túbulo colector de papila renal, donde se ubican las proteínas de los CF y las UA, cumple un rol esencial en la preservación *in vivo* de estas estructuras de adhesión celular [113, 114, 115].

La detección de los genes que codifican a las SMSs, como así también el descubrimiento de inhibidores farmacológicos, ha favorecido el aumento de trabajos cuyo interés es dar conocer el papel que cumplen los esfingolípidos en las células. El silenciamiento génico de las isoformas de las enzimas SMSs mostró cambios en la cantidad de SM exclusivamente en los dominios raft de la membrana de células HEK 293 [133, 134], como así también el impedimento para formar UA maduras, y por lo tanto, la adquisición de un fenotipo epitelial maduro de células MDCK [135]. Estos resultados refuerzan la importancia que tiene el mantenimiento de composición lipídica en regiones específicas de las membranas para la preservación de las funciones celulares.

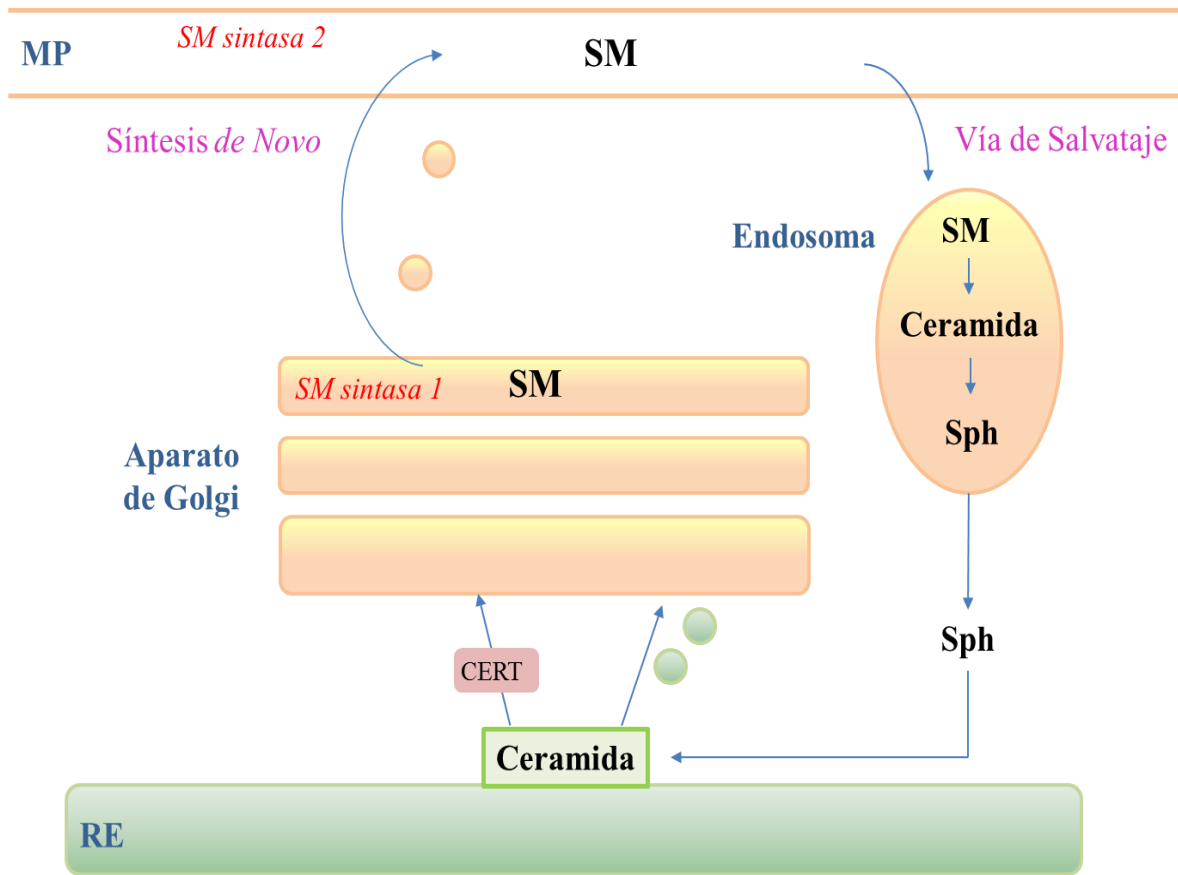


Figura 6. Esquema de la vía de *síntesis de novo* y la *vía de salvataje* de los esfingolípidos.

C-Trasporte intracelular de las membranas

El proceso de reciclaje de proteínas tales como receptores y canales iónicos ha sido estudiado con el objeto de entender la dinámica de las mismas dentro de la célula. En los últimos años, se ha relacionado con este proceso, a proteínas que componen regiones especializadas de la célula, como son la región apical y basolateral [136]. En este sentido, uno de los mecanismos de reciclaje que ha sido muy estudiado, es el de E-cadherina. Se sabe que las UA mantienen un activo recambio dado por la internalización del complejo de adherencia por la vía endocítica, con su posterior reciclaje a través del transporte vesicular. A su vez, la E-cadherina presenta una vida media de 5-10 h. Por ello, el eficiente tráfico vesicular de esta proteína resulta fundamental para el mantenimiento del estado diferenciado y la arquitectura celular [137, 138].

Las vesículas localizadas en el interior de las células no se mueven de forma aleatoria, sino que existen factores específicos que se encargan de coordinar y asegurar la precisión entre la fusión de las membranas. Una familia de estos factores son las proteínas Rab GTPasas, que son

pequeñas, con un peso molecular entre 21-25 kDa, y se asocian a la cara citosólica de la membrana de vesículas como así también de organelas endo- y exocíticas [139, 140, 141]. La localización específica que presentan las Rabs ha permitido usarlas como marcadores de diferentes compartimentos celulares [139, 142]. Rab 5 es un marcador de endosomas tempranos, y es necesaria para que se produzcan los procesos de internalización endocítica y fusión de la membrana de los endosomas (Figura 7) [139, 143]. Rab 11 es un marcador de vesículas que provienen del trans Golgi y de los endosomas de reciclaje (Figura 7). La presencia de Rab 11 es necesaria para el transporte de las vesículas desde el trans Golgi y el reciclaje endocítico de las regiones apical y basolateral de las membranas plasmáticas [139, 144].

Debido a la localización de las enzimas, la síntesis de SM cumple un papel importante en la formación de las vesículas en el aparato de Golgi, como así también en el mantenimiento de la composición de la membrana plasmática [122]. Recientemente se ha reportado que la inhibición farmacológica de las enzimas SMSs es capaz de suprimir la secreción de insulina, evidenciando la importancia de la presencia de este esfingolípidio para regular la secreción de moléculas endógenas [145].

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la estimulación de las células del túbulo colector de la papila renal con la hormona BK, induce la disipación de vinculina de los CF, concomitantemente con la aparición de vesículas en el citosol que contienen vinculina y PIP_2 [146]. Esta internalización de la molécula de vinculina se produce por un mecanismo que no depende de la pinocitosis de la fase fluida ni de la potocitosis (endocitosis dependiente de caveolina-1). El PIP_2 ha sido largamente implicado en el reclutamiento de proteínas en las membranas [147], y en el proceso de vesiculización [148, 149, 150], y además muchas proteínas que participan en el proceso de endocitosis contienen sitios de unión a PIP_2 [151]. Las vesículas que contienen vinculina, que se observan al minuto de estimulación con BK, se acumulan en la región perinuclear de las células del túbulo colector donde se localiza el compartimento endosomal de reciclaje, mientras que a tiempos prolongados, se localizan en la región marginal. Estos resultados revelaron que la vinculina, es transportada intracelularmente por vesículas enriquecidas en PIP_2 y sólo abandona dichas vesículas al ser reclutada por talina para conformar los CF. Estas vesículas, mediante una vía polarizada de exocitosis, transportarían vinculina a los sitios de armado de los CF, por un mecanismo que depende de la integridad del citoesqueleto de actina [146]. Estos resultados motivaron a profundizar el estudio del efecto modulador de la BK sobre las estructuras de adhesión célula-matriz extracelular, y a caracterizar estas vesículas con el fin de plantear un modelo de distribución intracelular de vinculina en este tipo celular.

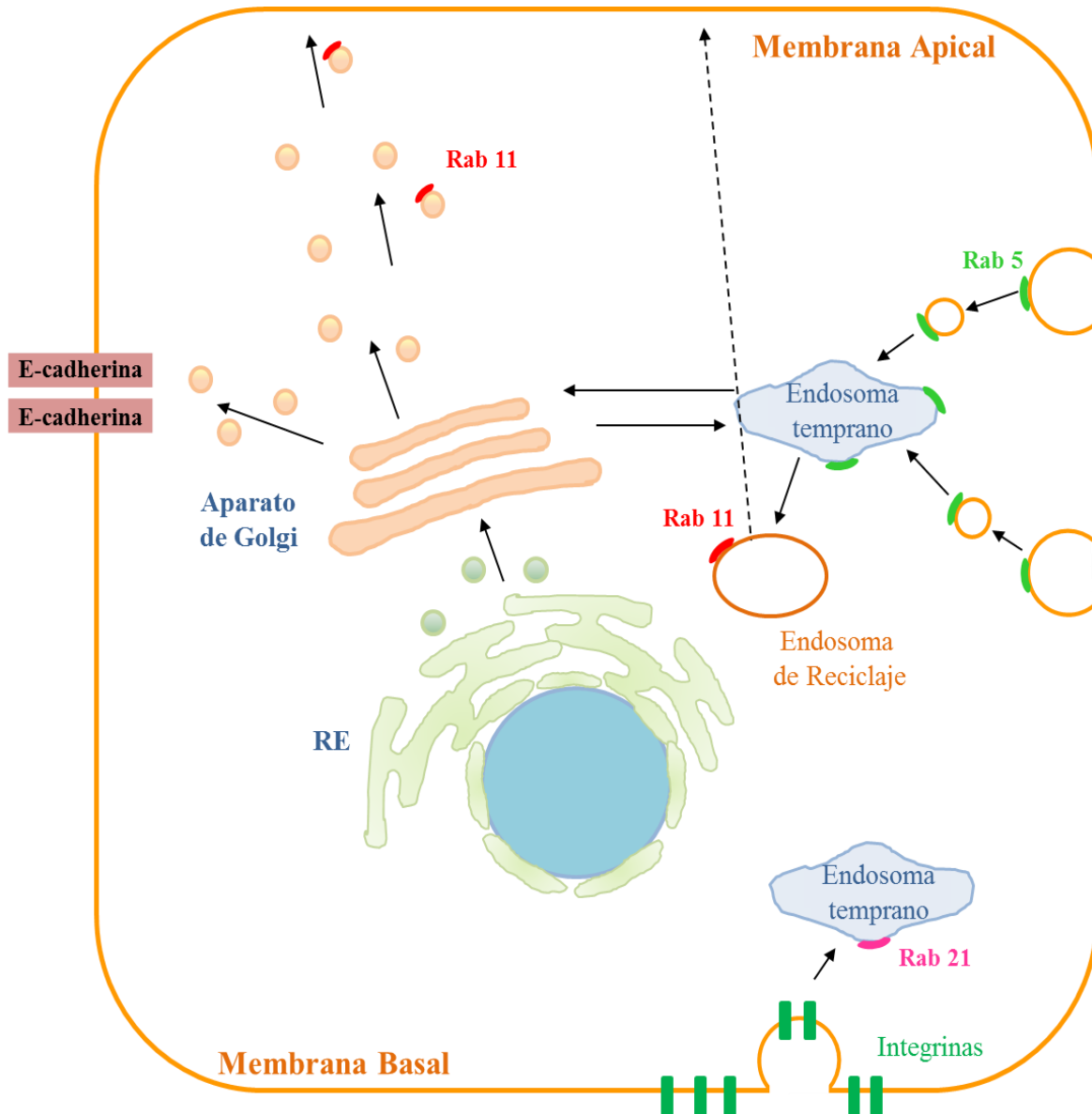


Figura 7. Esquema de la distribución y localización de Rab 5, Rab 11 y Rab 21 en las células epiteliales

D- El citoesqueleto y su participación en el transporte intracelular

Los principales componentes del citoesqueleto implicados en el transporte intracelular son los filamentos de actina (FA) y los microtúbulos. Los FA participan en el transporte a corto alcance o local, mientras que los microtúbulos son los encargados de realizar el transporte de largo alcance. Para poder realizar el transporte, es necesaria la unión específica de proteínas motoras al citoesqueleto y a las vesículas, y este proceso es mediado principalmente por la familia de las ya mencionadas Rab GTPasas [139]. Un subtipo de Rab 11, Rab 11A, se asocia de forma

directa a la proteína transportadora miosina Vb para promover el transporte de los endosomas de reciclaje a través de los FA, desde el centro de la célula hacia la periferia [152]. Los endosomas tempranos que contienen Rab 5 también son transportados por los FA hacia el interior de las células al unirse a miosina VI [153]

Los microtúbulos se organizan y crecen desde el centrosoma (ubicado en la región perinuclear) hacia la membrana plasmática. El transporte desde el centro de la célula hacia la periferia, como en el caso de los endosomas de reciclaje, es mediado principalmente por las proteínas motoras kinesinas, aunque también se ha descrito que estas participan del transporte de vesículas Rab 5 positivas, desde la periferia hacia el centro de las células [154]. El transporte de vesículas desde la periferia celular hacia el centro de las células, tal como en los endosomas tempranos, que luego se transforman en tardíos para finalmente acercarse y fusionarse con los lisosomas, es promovido por la acción de las proteínas dineínas [155]. Adicionalmente, algunas proteínas motoras se asocian con la membrana de las vesículas al interaccionar regiones específicas de su estructura con lípidos como el PIP₂ [156].

4. ELECCIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO

Dado que el riñón es un órgano que presenta considerable heterogeneidad celular, sus aspectos funcionales resultan más sencillos de analizar *in vitro* [157]. Además, se torna muy complejo modificar y controlar los solutos del parénquima renal *in vivo*, por lo que las células en cultivo han sido extensamente utilizadas para diversos estudios [158].

En los cortes histológicos no es posible detectar estructuras como los CF, que unen las células a la matriz extracelular, pero estos sí pueden ser estudiados en cultivos celulares [75, 146]. En las décadas de los 80-90 surgieron publicaciones que utilizaron cultivos primarios de células del túbulo colector que permitieron comenzar a profundizar los conocimientos sobre este tipo celular [159, 160]. La gran ventaja que tienen las células del túbulo colector de la papila renal en el cultivo primario, es que poseen la capacidad de secretar su propia matriz extracelular y formar monocapas que mantienen la estructura epitelial por varios días, imitando el funcionamiento que presentan en el tejido intacto [75, 115, 146, 159, 160, 161].

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo de tesis tiene dos objetivos generales:

- 1- Profundizar el estudio de la regulación fisiológica de vinculina en los túbulos colectores de la papila renal.
- 2- Analizar la participación de la vinculina en el mantenimiento de las estructuras de adhesión celular en los túbulos colectores de la papila renal

OBJETIVOS ESPECIFICOS

En particular, en la presente tesis doctoral se abordaron los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el modelo de estudio analizando la expresión de marcadores del tejido renal diferenciado.
- Realizar la caracterización bioquímica de las vesículas que contienen vinculina con el fin de plantear un modelo de distribución intracelular de vinculina en células de túbulo colector de papila renal.
- Investigar si además del citoesqueleto de actina, los microtúbulos participan en el transporte intracelular de las vesículas.
- Investigar si la formación de estas vesículas es un fenómeno específico de bradiquinina o un fenómeno general.
- Analizar el efecto de la inhibición de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de las estructuras de adhesión célula-célula.

- Estudiar el efecto de la inhibición de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de las estructuras de adhesión célula-matriz extracelular y en el citoesqueleto de actina.
- Estudiar la reversibilidad del proceso de inhibición de la esfingomielina sintasa sobre las estructuras de adhesión célula-célula.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- ANIMALES DE ESTUDIO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300 gr) los cuales fueron criados sin restricciones de agua o comida, bajo condiciones controladas de luz (ciclos de 12 hs de luz / oscuridad) en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Humana - IICSHUM-UNLaR. Los animales fueron manipulados de acuerdo a las normas de cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Nacional de La Rioja. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Nacional de La Rioja (CICUAL-UNLaR).

2- OBTENCIÓN DE CORTES DE PAPILA RENAL Y FRACCIONAMIENTO CELULAR

Los animales se sacrificaron por medio de dislocación cervical, e inmediatamente se extrajeron los riñones utilizando material de uso quirúrgico. Luego se removieron las papilas renales y se recolectaron en buffer Tris frío, conformado por Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 2 mM, CaCl 1 mM y glucosa 5.5 mM. Las papilas fueron cortadas en láminas delgadas (0.5 mm de espesor) para facilitar la acción de los agentes a estudiar sobre el tejido, utilizando un micrótopo Stadie-Riggs, y fueron mantenidas en el buffer Tris frío hasta su procesamiento. En los experimentos realizados con cortes de papila renal se incubaron a 37°C en un baño metabólico con agitación en ausencia o presencia de BK a concentración 1 µM por 5 min, Neomicina 1 mM por 10 min o Metil-β-ciclodextrina por 30 min. Las incubaciones fueron detenidas colocando los tubos en hielo y agregando buffer Tris frío. Posteriormente, cada muestra fue homogeneizada en un volumen adecuado de buffer de homogeneización, conformado por sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 25 mM pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y Na₃VO₄ 1 mM. El homogenato resultante fue centrifugado a 860 g por 15 min para obtener el sobrenadante postnuclear (SPN), el cual fue separado y alicuotado. En algunos experimentos se centrifugó a 105,000 g por 60 min. El pellet resultante correspondió a la fracción microsomal y el sobrenadante a la fracción citosólica. Dependiendo del experimento, se utilizó el SPN o la fracción microsomal como material de partida para el aislamiento de las vesículas. El contenido proteico del SPN, fracción microsomal y citosólica fue estudiado por el método de Lowry [162]. Para estudiar la pureza de la fracción microsomal

se determinó la presencia de la sub-unidad β de la ATPasa Na^+/K^+ mediante la técnica de Western Blot.

3- AISLAMIENTO DE VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA

Las vesículas fueron aisladas por un método inmunomagnético aplicando el protocolo provisto por el fabricante (Dynabeads M-500 y M-280 subcellular – Invitrogen). Para evaluar el rendimiento, se aplicaron dos métodos diferentes para el aislamiento de las vesículas que contenían vinculina. En el *método directo* el SPN o la fracción microsomal se incubó con las esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti- vinculina, en una relación 8 μg de anticuerpo cada 10^7 esferas suspendidas en buffer A (PBS pH 7.4, EDTA 2 mM y suero fetal bovino al 5%). Para lograr el recubrimiento, las esferas se enfrentaron con el anticuerpo durante 12 hs a 4°C con agitación constante en una rueda giratoria. Para el aislamiento de las vesículas, la incubación de la muestra se realizó manteniendo la relación de 200 μg de la fracción subcelular con 1.4×10^7 esferas magnéticas. En el *método indirecto*, en cambio, la fracción subcelular se incubó previamente con concentraciones saturantes del anticuerpo anti-vinculina. Después de remover por ultra centrifugación el anticuerpo no unido, se llevó a cabo la incubación del material de partida con las esferas recubiertas con el anticuerpo secundario (linker), siguiendo el mismo procedimiento que en el método directo. Finalmente, los tubos procesados con el método directo e indirecto, se colocaron en un imán por 2-3 min. Luego las vesículas *unidas* a las esferas magnéticas se lavaron 3 veces por 15 min utilizando el buffer A, y se resuspendieron en 70-100 μl del mismo buffer (Figura 8). Como control negativo, se utilizaron esferas que no tenían unido el anticuerpo anti- vinculina o se les unió un anticuerpo monoclonal irrelevante como el anticuerpo dirigido contra ciclina-D. En los experimentos que se utilizó como material de partida el SPN, se reservaron para su posterior estudio: las fracciones *unida* (Bound: B) y *no unida* (Not Bound: NB) a las esferas magnéticas. En ambas fracciones se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry [162], y se utilizó la misma cantidad de ambas fracciones para los ensayos de inmunoblot.

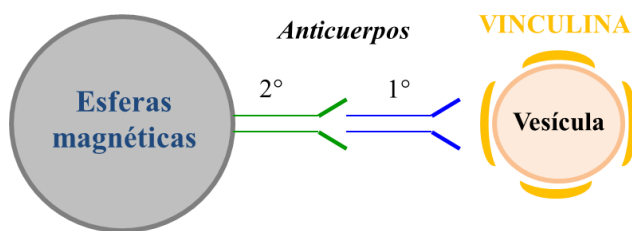


Figura 8-Esquema que representa el método de aislamiento inmunomagnético. La unión del anticuerpo dirigido contra vinculina (anticuerpo primario), a las esferas magnéticas (método directo) o a las vesículas (método indirecto), permitió aislar de forma específica las vesículas que contienen esta proteína del resto de vesículas presentes en el SPN o fracción microsomal obtenidas a partir de células del túbulo colector de papila renal.

4- ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se utilizó la microscopía electrónica de transmisión para poder visualizar los elementos aislados por el método inmunomagnético. Alícuotas de la fracción *unida* y de las esferas control, se fijaron con una mezcla de formaldehído al 4%, glutaraldehído al 1.5% y buffer cocodilato 0.1 M pH 7.3, a temperatura ambiente por 2 hs. Luego las muestras se lavaron y post-fijaron usando tetróxido de osmio al 1%. Posteriormente, el material fue deshidratado con acetona y embebido en Araldite (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Utilizando un ultra-micrótomo JEOL con cuchilla de diamante las muestras se cortaron en secciones delgadas, las cuales fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las observaciones se realizaron utilizando un microscopio de transmisión LEO 906-E (Carls Zeiss) y las fotografías se tomaron con una cámara megaview III. El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en el Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

5- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA MEMBRANA DE LAS VESÍCULAS

Para estos ensayos se emplearon soluciones de alta concentración salina y de pH alcalino. Como material de partida, se utilizó la fracción microsomal (150-250 µg de proteínas) obtenida a partir de cortes de papila renal (0.5 mm de espesor) previamente tratadas con BK 1 µM por 5 min, las cuales se incubaron con un volumen adecuado de las soluciones madre de Na₂CO₃ 1 M pH 10 o KCl 3 M en Tris/HCl 10 mM pH 7.4 para obtener una concentración final de Na₂CO₃ de 0.1 M y 0.5 M, y de KCl de 1, 2 y 3 M, durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, las muestras se centrifugaron a 100,000 g durante 1 hr, los pellets resultantes se solubilizaron en un volumen adecuado de buffer Laemmli (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 (GE-Healthcare); 2 % SDS (Amershan-Biosciences); 5 % β-mercaptoetanol (ICN Biomedical); 10 % glicerol (USB-Bio)), las proteínas del sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético y posteriormente se solubilizaron con el buffer Laemmli. Se sembró la misma cantidad de proteínas, y finalmente se analizó la presencia de vinculina mediante Western Blot.

6- EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA DE LAS VESÍCULAS - ENSAYOS DE PARTICIÓN DE FASES CON TRITÓN X-114

La fracción microsomal obtenida a partir de los cortes de papila tratadas con BK 1 µM durante 5 min (200 µg de proteínas), se resuspendió en 200 µl de la solución Tritón X-114 al 1%, Tris/HCl 10 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM. Posteriormente se realizó la separación de fases incubando las muestras, inicialmente a 4°C durante 10 min y luego a 20°C durante 20 min. Las muestras de ambas fases se aislaron centrifugando suavemente los tubos para separar la

fracción rica en detergente de la fracción acuosa, localizadas en la parte inferior y superior, respectivamente. Las proteínas integrales de membrana particionan en la fase rica en detergente, mientras que la mayoría de las proteínas solubles se localizan en la fase acuosa [163] (Figura 9). Luego, se analizó la presencia de vinculina y del receptor de transferrina (como marcador de proteína integral de membrana) en ambas fases mediante Western Blot.

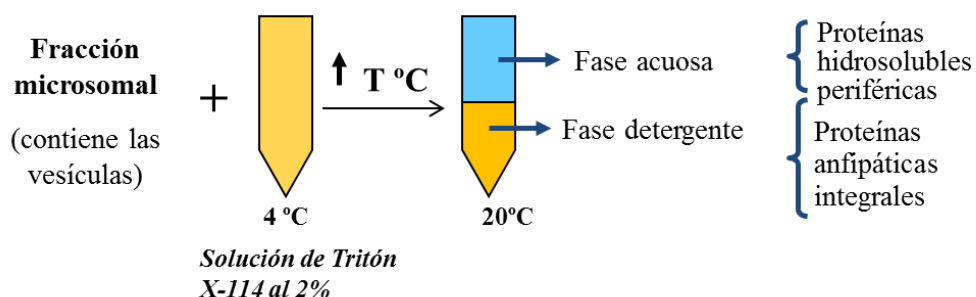


Figura 9-Esquema que representa el método de separación de proteínas integrales y periféricas de la membrana de las vesículas. Como material de partida se usó la fracción microsomal obtenida a partir de células del túbulo colector de papila renal.

7- ENSAYO DE PROTECCIÓN A LA ACCIÓN DE PROTEASAS

La fracción microsomal (100 µg de proteína en sacarosa 320 mM y HEPES 10 mM pH 7.4) obtenida de cortes de papila (0.5 mm) previamente tratadas con BK, se incubó a 0 °C durante 40 min con un volumen adecuado de CaCl₂ 10 mM en presencia de 10 µg y 40 µg de tripsina, con el agregado o no de Tritón X-100 al 1%. Pasados los 40 min de incubación se agregaron 40 µg de aprotinina a cada muestra, y se continuó con la incubación durante 5 min en hielo. Después de la ultracentrifugación durante 1 hr a 100,000 g, los pellets obtenidos correspondieron a la fracción de membrana resistente a la proteasa, y los sobrenadantes a la fracción de membrana sensible a la acción de la enzima. Luego, se analizó la presencia de vinculina y de la sub-unidad β de la ATPasa Na⁺/K⁺ en ambas fracciones mediante Western Blot.

8- ANÁLISIS DE LAS VESÍCULAS POR ESPECTROSCOPIA DE MASA (CROMATOGRFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASA/ESPECTROMETRÍA DE MASA - LC-MS/MS LC-MS/MS)

Este estudio fue llevado a cabo en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas y Espectrometría de Masa (Lanais Pro Em-Conicet — Argentina). Para

ello, los cortes de papilas se incubaron con BK y posteriormente se realizó la homogenización de las muestras, las cuales se centrifugaron a 4000 g por 10 min a 4°C. Los pellets se resuspendieron en 1 ml del buffer de homogenización (sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 25 mM pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y Na₃VO₄ 1 mM) y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante fue centrifugado a 17,000 g por 20 min a 4°C. El pellet resultante representó a la fracción de membranas de alta densidad (**High Density-HD**). El sobrenadante se centrifugó a 200,000 g por 60 min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 500 µl de PBS y se centrifugó nuevamente durante 60 min bajo las mismas condiciones. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 520 µl de PBS y representó a la fracción de membranas de baja densidad (**Low Density-LD**). Esta última fracción se usó para el inmunoaislamiento de las vesículas recubiertas con vinculina. Para ello, 1000 µg de proteínas de la fracción LD se incubaron con 400 µl de esferas magnéticas recubiertas con vinculina, durante 17 hs a 4°C en agitación constante en la rueda giratoria. Luego el tubo se colocó en un imán y se descartó en sobrenadante. Las vesículas unidas a las esferas se lavaron 3 veces por 15 min con PBS pH 7.4 / EDTA 2 mM, y se resuspendieron en 400 µl del mismo buffer. Para el análisis de espectroscopía de masa se sembró una alícuota de 350 µl de la suspensión de vesículas aisladas, y los 50 µl restantes se utilizaron para investigar la presencia de vinculina por Western Blot. Para ello, las proteínas se eluyeron y solubilizaron añadiendo un volumen adecuado de buffer Laemmli, con posterior calentamiento a 100°C durante 5 min.

Según la literatura, la fracción LD obtenida a partir de este procedimiento se encuentra libre de restos de membrana plasmática [164]. Para corroborar esto, analizamos la presencia de la subunidad β de la ATPasa Na⁺/K⁺ en las fracciones HD y LD mediante Western Blot.

Las vesículas inmunoaisladas fueron separadas usando minigeles de poliacrilamida al 10%, los que posteriormente se colorearon con azul de Coomassie durante 40 min para visualizar las proteínas separadas. Las bandas correspondientes a un peso molecular igual o mayor a 40 kDa fueron cortadas y decoloradas con la mezcla metanol: agua: ácido acético (50:50:1) durante 120 min a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron secadas y luego reducidas con ditiotretitol 10 mM en NH₄HCO₃ 100 mM por 1 hr a 56°C. Se removió el sobrenadante y luego se añadió una solución acuosa de iodacetamida 55 mM en NH₄HCO₃ 100 mM. Se incubó durante 45 min a 22°C en la oscuridad para bloquear los residuos de cisteína reducidos. Posteriormente se removió el sobrenadante y los fragmentos de gel fueron lavados dos veces con acetonitrilo en NH₄HCO₃ 100 mM durante 15 min. Las proteínas se tripsinizaron usando 25 ng/µl de tripsina de grado de secuenciación modificado (Promega, Madison, WI), diluida en NH₄HCO₃ 50 mM y se incubó a 37°C durante 16 hs. Los péptidos se extrajeron del gel usando una solución de acetonitrilo al 50% / ácido fórmico al 0.5%, se secaron y finalmente se reconstituyeron con ácido fórmico al 0.1%. Los péptidos tripsinizados de cada fragmento de gel se analizaron mediante LC-MS/MS usando un equipo LCQ Duo (Thermo Finnigan, San José, CA). La separación cromatográfica de los péptidos fue realizada utilizando una columna de fase reversa C18 - 250 × 1.0 mm (Vydac 218TP51). Se aplicó un gradiente usando el solventes B (acetonitrilo al 80%, ácido fórmico al 0.1%) y solvente A (ácido fórmico al 0.1%) en las

siguientes concentraciones (solvente B / solvente A) y tiempos: 2-15% durante 10 min; 15-50% 70 min; 50-80% 8 min; 80-100% 2 min y 100% del solvente B durante 2 min a una velocidad de flujo de 40 μ l/min.

Los espectros de los péptidos y sus iones fragmentados fueron grabados mediante un método que permite la obtención de tres adquisiciones MS2 (por ejemplo, para los tres picos de intensidad más altos en las exploraciones MS1) siguiendo cada escaneo completo de MS. Para el análisis de los espectros se utilizó la base de datos global de proteínas de SwissProt y se usaron los motores de búsquedas SEQUEST (Thermo Finnigan) y MASCOT (Matrix Science). Los parámetros de búsqueda incluyen: exactitud de la masa iónica precursora= 1.7 amu, exactitud del fragmento de masa iónica= 0.6 amu, modificaciones permitidas para cisteínas (acetamidometilcisteína) y dos clivajes perdidos permitidos. Después de haber realizado la secuenciación del péptido y la identificación de la proteína a partir del software SEQUEST, los péptidos identificados se filtraron utilizando la puntuación de correlación cruzada (Xcorr) en el siguiente umbral: Xcorr N 1.5 para 1+ ion, 2.0 para 2+ ion, y 2.5 para 3 + ion. A partir de este, se obtuvo una lista de proteínas de peso molecular mayor o igual a 40 kDa cuya identificación fue validada por la presencia de dos o más péptidos componentes o de un péptido y la inspección manual del espectro.

9- CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR DE PAPILA RENAL

Los riñones se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2. Luego se mantuvieron en una solución de iodopovidona para evitar contaminaciones hasta su procesamiento en el flujo laminar. Utilizando material de cirugía estéril, se extrajeron las papilas y se mantuvieron en buffer fosfato PBS y se continuó de acuerdo al protocolo descrito por Stokes *et al* [160]. Las papilas fueron cortadas en trozos pequeños de 1-2 mm³ y posteriormente fueron incubados en buffer Tris conteniendo 0.1% de colagenasa II a 37 °C, 95% O₂ / 5% CO₂. Después de 70 min de incubación, las estructuras celulares fueron separadas por centrifugación a muy baja velocidad (175 g) por 2 min. El pellet crudo conteniendo varios tipos celulares, estructuras tubulares y restos de tejido, fue lavado dos veces con PBS y posteriormente resuspendido en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 (DMEM/ F-12, Gibco, Invitrogen), suplementado con suero fetal bobino al 10% (SFB, Natocor), penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 μ g/ml. Esta suspensión se centrifugó a muy baja velocidad por 2 min para obtener un pellet rico en túbulos colectores, el cual fue resuspendido en un volumen adecuado de DMEM/F-12. Dependiendo del experimento a realizar, la suspensión celular se sembró sobre cubreobjetos estériles para la realización de inmunocitoquímica o directamente sobre el plástico de la placa multiwell de seis pocillos. Después de 96 hs de crecimiento a 37°C, los cultivos destinados al estudio de la distribución intracelular de vinculina, las células fueron o no, tratadas con BK 1 μ M durante 1,5 y 10 min.

Para otros análisis, las células fueron tratadas con metil- β -ciclodextrina 5 mM durante 30 min, o con neomicina 1 mM durante 10 min (Figura 10). Las incubaciones se detuvieron rápidamente en hielo y las células se procesaron para los estudios de microscopía de fluorescencia.

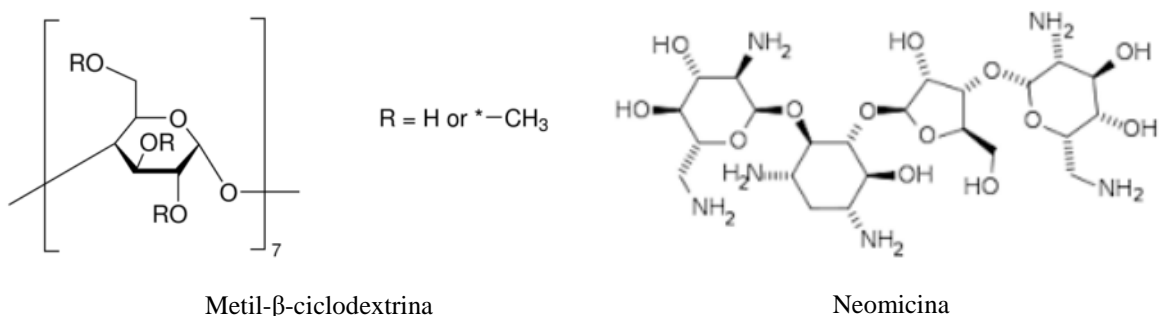


Figura 10-Representación gráfica de la estructura molecular de los agentes químicos usados para el estudio de la formación de las vesículas que contienen vinculina en las células del túbulo colector de la papila renal.

En los casos que no se aplicaron ningún tratamiento, una vez cumplidas las 96 hs de crecimiento, las células se procesaron para inmuno-marcación.

Para analizar la participación de los microtúbulos en la reestructuración de los CF, las células del cultivo primario se incubaron con colchicina 10 mM, un agente despolimerizante de los microtúbulos, durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se estimularon las células con BK 1 μM durante 1, 5 y 10 min. Finalmente, las células se procesaron rápidamente para inmunomarcación con un anticuerpo anti-vinculina.

9.1 Inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa

Se utilizó triciclododecan-9-yl-xantogenato (D609, Sigma Aldrich) como inhibidor farmacológico de las esfingomielina sintasas (Figura 11). Después de 72 o 96 hs de crecimiento a 37°C, este inhibidor se agregó al medio de cultivo en una concentración final de 20, 50 y 100 μM para los estudios de microscopía de fluorescencia, y 50 μM para los estudios de cuantificación. Se incubó durante 24 horas y luego las células fueron rápidamente procesadas de acuerdo al protocolo a seguir.

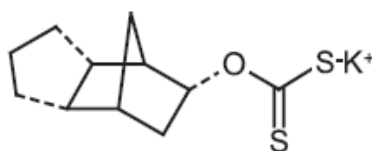


Figura 11-Representación gráfica de la estructura molecular del inhibidor D609

Para los estudios de cuantificación de proteínas de las uniones adherentes, después de la incubación con el inhibidor, las células se lavaron con PBS. Luego a cada pocillo se agregó un volumen adecuado de buffer de homogenización (sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 25 mM pH 7.4, MgCl₂ 3 mM, EGTA 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml y Na₃VO₄ 1 mM). Para despegar las células adheridas a la placa de cultivo, la monocapa se raspó sobre hielo -para disminuir el daño celular- utilizando un “rastrillo” apropiado. Las suspensiones celulares fueron recolectadas en tubos, y el lisado se realizó pasando las células por una jeringa con aguja de 28-G. El lisado resultante se centrifugó a 860 g durante 15 min. Una alícuota del SNP se utilizó para la determinación de proteínas totales. Mediante Western Blot se analizaron las proteínas de las uniones adherentes E-cadherina, β - y α -catenina, y vinculina, y la estimación de la densidad óptica de las bandas se realizó mediante el software Gel-Pro Analyzer version 3.1 (Media Cybernetics).

9.2 Silenciamiento génico de las isoformas de la esfingomielina sintasa

El knock down de las enzimas esfingomielina sintasa (SMS) 1 y 2 fue realizado mediante el uso de un siRNA específico para cada isoforma (Invitrogen). Para ello se utilizó el kit de transfección HiPerFect Transfection Reagent (QUIAGEN), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. La eficiencia de transfección se determinó mediante la co-transfección del conjugado de siRNA con AlexaFluor 488 (All Stars Negative Controls-QUIAGEN). A las 48 hs de cultivo, cuando las células habían adquirido un alto nivel de asociación, se preparó una dilución de cada siRNA (el correspondiente a la SMS1 o 2 y el control) conteniendo el volumen de siRNA necesario para una concentración de 40 nM y del conjugado de 5 nM en cada pocillo, en un volumen de DMEM/F12 (sin suero) de 100 µl. En cada tubo se agregó además un volumen de 6 µl del reactivo HiPerFect Transfection Reagent, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Estas soluciones se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente antes de colocarse en cada well, que contenían 900 µl de DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% cada uno. Luego de incubar las células con las soluciones durante 60 min a 37°C, 5% CO₂, se agregó a cada pocillo 1 ml de DMEM/F12 suplementado con SFB al 10%, y se incubó durante 24 h a 37°C. Una vez cumplido el tiempo se procedió con el protocolo de fijación y marcación con anticuerpos descrito en el punto 12.

La siguiente tabla indica las secuencias de los siRNA utilizados para realizar el silenciamiento génico de las dos isoformas de la SMS (SMS1 y SMS2)

| | | |
|------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| SMS1 | 5'-ACCUGUUGCACCGAUUAUCAATT-3' 5'-UUGAAUAUCGGUGCAACAGGUTT-3' | Gen ID: 477582, esfingomielina sintasa 1, Canis lupus familiaris |
| SMS2 | 5'-GGCACCAAAAAGTACCCAGA-3' 5'-GAGTCTCCGTTGAGCTTTGG-3' | Gen ID: 478505, esfingomielina sintasa 2, Canis lupus familiaris |

9.3 Reversibilidad de la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa

Para estudiar la reversibilidad del efecto provocado por la inhibición de la actividad de las esfingomielina sintasas (SMSs) sobre las uniones intercelulares, se realizaron cultivos primarios como se describió anteriormente. A las 72 hs del cultivo, cuando las células formaban una monocapa, se agregó el inhibidor D609 en la concentración de 50 μ M y se incubó durante 24 hs adicionales a 37°C. Una vez cumplido el tiempo, para eliminar el inhibidor del medio de cultivo, se lo reemplazo por medio de cultivo fresco, lo que constituyó el “lavado” de las células, y en estas condiciones, las células se incubaron por 24 hs adicionales. Finalmente, las células se procesaron para estudios de inmunomarcación usando anticuerpos dirigidos contra vinculina y α -catenina.

10- DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Una vez obtenida la suspensión de túbulos colectores de la papila renal según el protocolo descripto en el apartado 9, se determinó el número de estructuras tubulares totales a sembrar en los pocillos, mediante el uso de la cámara de Neubauer. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de exclusión del azul tripán. El colorante se preparó mezclando 4 partes de solución acuosa de azul tripán (Mallinckrodt) al 0,2 % y 1 parte de solución salina de NaCl al 4,25 %. Se mezclaron 20 μ l de esta solución con 20 μ l de la suspensión tubular y se determinó el número de estructuras tubulares viables (no coloreadas) y no viables (coloreadas). El porcentaje de viabilidad se determinó calculando el porcentaje de estructuras tubulares no coloreadas sobre el total de las estructuras tubulares contadas.

11- ENSAYOS DE WESTERN BLOT

11.1-Proteínas asociadas a las vesículas que contienen vinculina

Las distintas fracciones obtenidas como el sobrenadante postnuclear (SPN), fracción microsomal y citosólica, fracciones HD y LD, y las fracciones *unidas* y *no unidas* a las esferas magnéticas, se separaron en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó en buffer de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris (Invitrogen), 192 mM glicina (BioRad), 0,1 % SDS (Amersham Biosciences) a una corriente constante de 15 mA (para un gel) o 30 mA (para dos geles). Paralelamente, se sembró en cada gel una alícuota de marcador de peso molecular (BioRad o Thermo-Fisher). Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF; GE-Healthcare). La transferencia se efectuó durante 2:30 hs a un voltaje constante de 60 volts, en una cámara húmeda (Mini-Protean 3; BioRad). Las membranas fueron incubadas durante 1 hr, a temperatura ambiente con agitación, en buffer TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1 % Tween-20 (Sigma) conteniendo 5 % de leche descremada en polvo, para bloquear los sitios de ligado inespecífico. Posteriormente las membranas se incubaron durante 12-24 hs a 4°C con el anticuerpo primario adecuado, preparado con la solución de bloqueo, y diluidos de acuerdo a la siguiente tabla:

| Anticuerpo primario | Especie de obtención | Dilución | Marcador de: | Origen |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Vinculina | ratón | 1:1000 | contactos focales uniones adherentes vesículas citosol | Sigma-Aldrich |
| Talina | ratón | 1:200 | contactos focales | Sigma-Aldrich |
| Paxilina | ratón | 1:200 | contactos focales | Sigma-Aldrich |
| Ciclina-D | ratón | 1:200 | ----- | Sigma-Aldrich |
| Rab5 | conejo | 1:500 | endosomas tempranos | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Rab11 | conejo | 1:500 | endosomas de reciclaje | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Receptor de transferrina (CD71) | conejo | 1:500 | endosomas de reciclaje membrana plasmática | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| sub-unidad β ATPasa Na^+/K^+ | conejo | 1:250 | membrana basolateral | Santa Cruz Biotechnology, Inc |

A continuación, las membranas se lavaron 3 veces con TBS y se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente, con una solución del anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado con peroxidasa (1/200 - Vector Laboratories) preparado en TBS-T. En este punto, y cuando fue necesario, se agregó el anticuerpo biotinilado dirigido contra PIP₂ (Echelon Biosciences). Luego, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y la unión de los anticuerpos primarios se evidenció utilizando el kit de quimioluminiscencia (ECL-Biolumina) o el kit de avidina-biotina peroxidasa (Vector Laboratories) y urea-3,3'diaminobencidina (Sigma Aldrich). El control de carga se realizó mediante tinción con Coomassie blue. La estimación de la densidad óptica de las bandas se efectuó mediante el software Gel-Pro Analyzer version 3.1.

Para analizar la expresión de una segunda proteína sobre una misma membrana, la elución de los anticuerpos primario y secundario se realizó mediante el lavado con un buffer compuesto por 2-mercaptoetanol 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 2% y Tris-HCl 62.5 mM (buffer stripping) durante 30 min a 60°C con agitación. Luego se continuó de acuerdo al procedimiento descripto previamente.

11.2-Precipitación de proteínas según el método descripto por Crowell

Con el objeto de concentrar la muestra, se aplicó el procedimiento de precipitación de proteínas con acetona descripto por Crowell *et al.* [165]. Para ello, se disolvió NaCl a concentración de 10 mM en las muestras de SPN obtenidas de los cultivos primarios tratados o no con D609 50 µM. Luego se agregó un volumen de acetona a cada muestra para obtener una concentración final de acetona al 80%. Las muestras se incubaron durante toda la noche a -20°C, y luego se centrifugaron a 16,000 g durante 20 min. Se removió cuidadosamente el sobrenadante, dejando un volumen de aproximadamente 20 µl en cada tubo. Se lavaron los pellets agregando el mismo volumen de acetona que se utilizó en el paso previo. Nuevamente se centrifugó a 16,000 g durante 20 min. Se descartaron los sobrenadantes y los restos de acetona se secaron con aire caliente. Los pellets obtenidos se resuspendieron en PBS y un volumen adecuado de buffer Laemmli, con posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. Las muestras se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, se realizó el Western Blot utilizando los siguientes anticuerpos primarios:

| Anticuerpo primario | Especie de obtención | Dilución | Marcador de: | Origen |
|---------------------|----------------------|----------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Vinculina | ratón | 1:1000 | contactos focales uniones adherentes citosol vesículas | Sigma-Aldrich |
| β-catenina | ratón | 1:1000 | uniones adherentes | Sigma-Aldrich |
| α-catenina | conejo | 1:300 | uniones adherentes | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| E-cadherina | ratón | 1:50 | uniones adherentes | Santa Cruz Biotechnology, Inc |

12- PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Para el proceso de inmunomarcación, las células se fijaron con metanol a -20°C durante 10 min y acetona a -20°C durante 4 min. Luego, los cubreobjetos fueron incubados en la solución de bloqueo PBS / seroalbúmina bovina (BSA) al 3% durante 1 hr a temperatura ambiente. Después del bloqueo, las células se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda con las combinaciones de anticuerpos primarios apropiados, preparados en solución de bloqueo y diluidos de acuerdo a la siguiente tabla.

| Anticuerpo primario | Especie de obtención | Dilución | Marcador de: | Origen |
|-------------------------------------|----------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Vinculina | ratón | 1:200 | contactos focales uniones adherentes citosol vesículas | Sigma-Aldrich |
| Talina | ratón | 1:50 | contactos focales | Sigma-Aldrich |
| β-catenina | ratón | 1:500 | uniones adherentes | Sigma-Aldrich |
| α-catenina | conejo | 1:100 | uniones adherentes | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| E-cadherina | ratón | 1:100 | uniones adherentes | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Rab5 | conejo | 1:200 | endosomas tempranos | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Rab11 | conejo | 1:200 | endosomas de reciclaje | Santa Cruz Biotechnology, Inc |
| Tubulina acetilada | ratón | 1:500 | cilio primario | Sigma-Aldrich |
| Citoqueratina 7 (CK- 7) | ratón | sin dilución | filamentos intermedios células epiteliales | Leica Biosystems |

La solución del anticuerpo primario fue lavada dos veces durante 10 min y otras dos veces durante 5 min con PBS a temperatura ambiente. Para realizar inmunomarcaciones dobles, se utilizaron anticuerpos secundarios dirigidos contra distintas especies de anticuerpos primarios (ratón y conejo) marcados con distintos fluorocromos: Alexa Fluor 488 (Molecular Probe)/ FITC (Isotiocianato de fluoresceína - Jackson Inmuno Research) (verde) y TRITC (Isotiocianato de tetrametilrodamina - Jackson Inmuno Research) (rojo), diluidos en PBS 1/200. En este punto, cuando fue necesario se agregó faloidina-FITC (1/1250 – Sigma Aldrich) para marcar los filamentos de actina, y Hoechst 33258 (1/1250 – Sigma Aldrich) para marcar los núcleos de color azul. Los cubreobjetos fueron incubados durante 60 min en cámara húmeda y posteriormente lavados con PBS a temperatura ambiente (10, 10, 5 y 5 min). Finalmente, se realizó el montaje sobre portaobjetos con 10 μl de Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) y los preparados se conservaron a 4°C hasta su visualización.

Tanto para las células transfectadas como aquellas en donde se estudió el citoesqueleto de actina, la fijación se realizó con una solución de paraformaldehído al 2% (p/v). En principio, los cultivos fueron lavados tres veces con PBS a temperatura ambiente, luego se realizó la fijación con una solución de paraformaldehído (Riedel-deHaën) al 2 % en PBS durante 20 min a temperatura ambiente, y posteriormente se realizaron dos lavados de 10 min y otros dos de 5 min con PBS a temperatura ambiente. La permeabilización celular se realizó con Tritón-X 100 al 0,1 % en PBS durante 20 min y luego se lavó cuatro veces con PBS a temperatura ambiente (10, 10, 5 y 5 min). Finalmente, se continuó con el procedimiento de bloqueo e incubación con los anticuerpos mencionados previamente.

Para el análisis de la expresión de glicoconjugados de membrana durante la caracterización de las células de túbulo colector en el cultivo primario, se utilizaron las siguientes lectinas:

| Lectina | Especie de obtención | Dilución | Marcador de: | Origen |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------|---------------------|
| DBA-biotinilada | Semillas de <i>Dolichos Biflorus</i> | 1:250 | Glicoconjugados presentes en células del TC | Vector Laboratories |
| BSL-I -FITC | Semillas de <i>Griffonia Simplicifolia</i> <i>Lectin I</i> | 1:80 | Glicoconjugados presentes en células mesenquimáticas | Vector Laboratories |

La lectina DBA se incubó junto con los anticuerpos primarios dirigidos contra vinculina y CK7 en la forma descripta previamente. El revelado de la lectina DBA se realizó utilizando estreptavidina conjugada con TRITC (1/400- Jackson Inmuno Research). La lectina BSL-I – FITC se agregó junto con la estreptavidina-TRITC y el marcador de núcleos Hoechst 33258 (1/1250 – Sigma Aldrich). El tiempo de incubación, lavados y montajes fueron los mismos a los descriptos previamente.

13- ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS IMÁGENES DE FLUORESCENCIA

13.1- Colocalización de proteínas en las vesículas

El análisis de los preparados se realizó en el Servicio de Microscopía Confocal que brinda la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UBA. Este servicio cuenta con un Microscopio Confocal Olympus FV 300 (modelo BX61) equipado con Láser Ar 488 nm, Láser HeNe verde 543 nm y Láser HeNe rojo 633 nm, cuya parte óptica está constituida por los objetivos 10X (AN=0,3), 40X (AN=1,0 - objetivo de inmersión), 60X (AN=1,4 - objetivo de

inmersión) y 100X (AN= 1,4 - objetivo de inmersión). Las imágenes confocales de doble marcación fueron obtenidas mediante escaneo secuencial para cada canal para eliminar interferencias entre los cromóforos y para asegurar una confiable cuantificación de la colocalización. Las imágenes confocales representan un único plano Z. Todas las imágenes se obtuvieron con una cámara refrigerada CCD y fueron procesadas mediante el software Adobe Photoshop. La aplicación de filtros Gauss para suavizar las imágenes, y el cálculo de los coeficientes de colocalización entre proteínas se realizó mediante el software Image-Pro Plus, versión 5.1.2 (Media Cybernetics, USA).

Los experimentos presentados en esta tesis fueron repetidos al menos 3 veces. Se seleccionaron entre 6-10 células al azar para realizar el análisis cuantitativo para cada tratamiento aplicado. Las células se analizaron con un objetivo Apo oil 100X (AN= 1.4) que cuenta con el software de adquisición FluoView versión 3.3 provisto por el fabricante, y se tomaron secciones ópticas horizontales correspondientes a la región media de las células. Se evaluó de forma cuantitativa la colocalización de antígenos a través del comando de colocalización provisto por el software. Para estimar el grado de colocalización, se utilizó el coeficiente de superposición de Manders (Manders' Overlap Coefficient – MOC) [166]. Cada valor de intensidad se encuentra definido entre 0 a 1, por lo tanto un valor $MOC \geq 0.7$ indica colocalización e implica que el 70% de ambos componentes de la imagen se superponen. Adicionalmente, se calcularon otros dos coeficientes de superposición: K1 y K2 (Overlap coefficient K1 and K2) [166]. Estos coeficientes dividen los valores de colocalización en dos parámetros por separado, permitiendo la determinación del grado de contribución de cada antígeno a las áreas de colocalización. Las mediciones se realizaron en la región perinuclear y marginal de las células. Para ello se dibujaron de forma manual, utilizando el puntero del mouse, el contorno del área perinuclear y marginal de las células (áreas de interés) en las imágenes confocales. A continuación, las imágenes fueron “segmentadas” con el comando presente en el programa. La aplicación de segmentos permite obtener a los objetos que colocalizan de color blanco sobre un fondo negro.

13.2- Recuento de contactos focales (CF)

En los experimentos en los cuales se analizó el efecto de la inhibición de la actividad de la esfingomielina sintasa sobre las estructuras de adhesión celular, se realizó un recuento del número de CF por célula. Estos experimentos se realizaron por triplicado. Se seleccionaron entre 5-10 células al azar para realizar el análisis cuantitativo de los CF conteniendo vinculina o talina. Las células fueron examinadas con el objetivo Plan 40X (AN=0.75) del microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX81 del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Humana (IICSHUM). Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software ImagePro Plus versión 5.1.2. Inicialmente se realizó la calibración espacial de las imágenes y se obtuvo un valor de medición de $0.3125 \mu\text{m}/\text{pixel}$. Se aplicó el “filtro flatten” para igualar las variaciones del fondo de las imágenes de fluorescencia, lo cual es recomendado en los análisis de recuento/medición debido a que este tipo de filtro disminuye las variaciones de la intensidad de los píxeles de fondo.

El recuento/medición de los CF se realizó seleccionando el rango de intensidad de estos objetos y luego se aplicó el comando de segmentación del programa, lo que permitió separar a los objetos de interés del fondo de la imagen. Luego, se dibujó manualmente el área de cada célula y se aplicó el comando contar/medir del programa para obtener el número de CF por célula. Los parámetros que se midieron a través del software fueron: tamaño (área del CF en μm^2), longitud promedio (LP - en μm), y el radio axial (RA – en μm). Este último define la forma de los CF, ya que considera al radio longitudinal de los ejes mayor y menor de las elipses. Un valor de RA <7 corresponde a una forma redonda-elipsoide, mientras que un valor >7 indica una forma alargada [167]. Para asegurar la obtención de mediciones válidas, especificamos el valor mínimo para cada medición utilizando el comando de ajuste de rango (set-range): 0.25 μm^2 para el área, 0.2 μm para la LP, 0.2 μm eje menor, y 0.5 μm para el eje mayor.

14- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los experimentos presentados en esta tesis fueron repetidos al menos 3 veces. Para cada experimento, los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar ($X \pm \text{ES}$) de cada resultado. Las diferencias entre los grupos fueron analizados por el test de Student (T-test) para comparar dos medias. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como indicativo de diferencia significativa entre los valores de las medias comparadas.

15. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo de los objetivos se abordó de acuerdo al diseño experimental detallado a continuación.

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA VINCULINA EN LOS TÚBULOS COLECTORES DE LA PAPILA RENAL

15.1- Caracterización del modelo de estudio mediante el análisis de la expresión de proteínas marcadoras de tejido diferenciado

Para el estudio del modelo celular, se realizaron cultivos primarios de células de túbulo colector (TC) de papila renal de ratas adultas (60-70 días). Se incubaron durante 96 hs a 37°C, tiempo necesario para que las células formen monocapas o láminas de células epiteliales. Posteriormente, las células fueron procesadas para estudiar mediante inmunocitoquímica la expresión de proteínas y glicoconjugados consideradas en la literatura como marcadores de tejido renal diferenciado [159]: lectina DBA (células de túbulo colector), tubulina acetilada

(cilio primario), citoqueratina-7 (filamentos intermedios de células epiteliales) y proteínas de uniones adherentes.

15.2- Caracterización de las vesículas que contienen vinculina

Para el estudio de las vesículas, se utilizó inicialmente cultivos primarios de células de TC de papila renal de ratas adultas estimulados con BK durante distintos tiempos, con el objeto de tener una población de células con abundantes vesículas. El análisis se realizó mediante inmunocitoquímica y posterior observación por microscopia confocal. Para el aislamiento y caracterización de las vesículas, se aplicó un método inmunomagnético. Como material de partida se usó el sobrenadante postnuclear o la fracción microsomal obtenidos a partir de cortes de papila (0.5 mm de espesor), estimuladas o no con BK. Las fracciones *unida* y *no unida* a las esferas magnéticas obtenidas mediante este método se separaron mediante SDS-PAGE con posterior Western Blot. Para el análisis de la especificidad del método de inmunomagnético de las vesículas que contienen vinculina, se utilizaron esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal irrelevante dirigido contra ciclina-D. Luego se verificó el aislamiento de estructuras vesiculares mediante microscopía electrónica de transmisión.

El análisis de la orientación de vinculina en las vesículas se realizó mediante ensayos de extracción con detergentes; y el estudio de las características de la asociación de vinculina a la membrana de las vesículas se realizó a través de los ensayos de incubación con soluciones de alta concentración iónica o pH alcalino. Todos estos ensayos se analizaron posteriormente mediante Western Blot.

La expresión de marcadores del compartimiento endosomal y de reciclaje, y la presencia de proteínas componentes de los CF en las vesículas aisladas mediante el método inmunomagnético, se analizaron por Western Blot.

Para completar la caracterización bioquímica de los componentes de las vesículas se realizó un estudio proteómico. Para ello se aislaron las vesículas y la fracción *unida* a las esferas magnéticas se sembró en geles de poliacrilamida al 10%. Posteriormente las bandas de un peso molecular igual o mayor a 40 kDa se cortaron y analizaron mediante espectrometría de masa.

15.3- Análisis de la distribución de las vesículas que contienen vinculina - Planteamiento de un modelo de distribución intracelular en células de túbulo colector de la papila renal.

Para el estudio de la dinámica de formación de las vesículas que contienen vinculina, se utilizaron cultivos primarios de células de TC de papila renal de ratas adultas estimulados con BK. Se analizó el grado de colocación de vinculina con las proteínas que participan en la vía de reciclaje endosomal (Rab 5 y Rab 11). Para ello se utilizó el coeficiente de colocación de Manders y los coeficientes de superposición K1 y K2. Posteriormente se evaluó si la estimulación con BK promueve cambios en la cantidad de Rab 5 y Rab 11 en las vesículas. Para ello, se aislaron las vesículas a través del método inmunomagnético a partir de

cortes de papila renal tratadas o no con BK durante 1, 5 y 10 minutos. Luego las muestras se analizaron mediante Western Blot.

15.4- Análisis de la participación de los microtúbulos en el transporte de las vesículas que contienen vinculina

Para este estudio se realizaron cultivos primarios de células de TC, se incubaron durante 96 hs a 37°C y posteriormente se trataron con el agente despolimerizante de los microtúbulos, colchicina 10 mM, durante 15 min previos a la estimulación con BK. Luego se analizó la presencia de vesículas conteniendo vinculina y la morfología celular, mediante inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia convencional.

15.5- Análisis de la especificidad de BK en la inducción de vesículas que contienen vinculina

Para este estudio se utilizaron agentes que alteran la composición lipídica de las membranas, y por ende, también la de los microdominios rafts. Para ello, en una primera etapa, se realizaron cultivos primarios de células de TC, y a las 96 hs de crecimiento se incubaron o no con metil- β - ciclodextrina (30 min) o con neomicina (10 min) y se procesaron rápidamente para inmunomarcación y posterior análisis por microscopía confocal, y se evaluó la formación de vesículas que contienen vinculina. El estudio bioquímico se realizó sobre muestras de vesículas aisladas mediante el método inmunomagnético a partir de cortes de papila tratados con los mencionados agentes. Luego las muestras se analizaron mediante Western Blot.

ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR EN EL TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL

15.6- Estudio de la participación de la actividad de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de las estructuras de adhesión intercelular

Para analizar el efecto de la inhibición de la esfingomielina sintasas (SMS) 1 y 2 sobre las estructuras de unión célula-célula se realizaron cultivos primarios de células de TC y se incubaron con el inhibidor farmacológico D609 o el correspondiente siRNA de las enzimas SMS1 y 2 durante 24 hs. Se analizó la distribución de las proteínas que conforman a las uniones adherentes mediante inmunocitoquímica y posterior microscopía de fluorescencia convencional y confocal. El estudio bioquímico se realizó analizando la expresión de las proteínas que componen los complejos adherentes a través de Western Blot a partir de muestras obtenidas de cultivos primarios incubados o no con el inhibidor farmacológico.

15.7- Estudio de la participación de la actividad de la esfingomielina sintasa en el mantenimiento de los contactos focales

Para este estudio se realizaron cultivos primarios de células de TC, y a las 72 hs de crecimiento se incubaron con el inhibidor D609 (50 μ M) durante 24 hs. Los cultivos se procesaron para microscopía de fluorescencia convencional. El estudio cuantitativo y morfométrico de los contactos focales inmunomarcados con vinculina y talina en las células incubadas o no con el inhibidor se realizó utilizando un software de análisis de imágenes.

15.8- Análisis de la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa sobre el citoesqueleto de actina

Para estudiar el efecto de la inhibición farmacológica de la SMS1 y 2 sobre el citoesqueleto de actina, las células del cultivo primario se incubaron o no con el inhibidor D609 (50 μ M) durante 24 hs, y se procesaron para inmunocitoquímica de doble marcado: faloidina para estudiar los filamentos de actina, y un anticuerpo dirigido contra vinculina para analizar los CF y las UA. El estudio se realizó mediante microscopía de fluorescencia convencional y confocal. En todos los casos, se analizó la organización del citoesqueleto de actina.

15.9- Estudio de la reversibilidad de los efectos producidos por la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa

Para analizar la reversibilidad de los efectos inducidos por la inhibición de las SMSs sobre las uniones adherentes (UA) se realizaron cultivos primarios de células de TC, y se incubaron con el inhibidor farmacológico D609 (50 μ M) durante 24 hs. Con el objeto de eliminar el inhibidor del medio, transcurridas las 24 hs de incubación se reemplazó el medio por medio de cultivo fresco y se incubó por 24 hs adicionales. Posteriormente, las células fueron procesadas para inmunocitoquímica y se marcaron con anticuerpos dirigidos contra vinculina y α -catenina. El análisis se realizó a través de microscopía de fluorescencia convencional. Se evaluó la formación de UA en las situaciones control, con D609 y después de la remoción del inhibidor.

RESULTADOS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA VINCULINA EN CELULAS DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL

1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE ESTUDIO

Los cultivos de células renales han sido ampliamente utilizados en las últimas décadas debido a que ofrecen la posibilidad de estudiar funciones del riñón en condiciones ambientales definidas, como por ejemplo la regulación hormonal y el desarrollo de los tejidos. En particular, el cultivo de células de los túbulos colectores renales provenientes de la papila renal ha sido aplicado a estudios metabólicos y bioquímicos como así también al transporte de iones con el objeto de investigar los mecanismos de regulación de agua y la excreción de electrolitos, necesarios para la formación de orina [159, 160].

Como se mencionó en la introducción, las células de los túbulos colectores renales participan en la etapa final de concentración de la orina, y se encuentran expuestas de forma constante a concentraciones osmolares intersticiales altas y baja presión de oxígeno [168]. Para cumplir esta función, la preservación del tejido intacto, es decir el mantenimiento de las uniones entre las células y con el entorno que las rodea, es esencial. Las primeras investigaciones del grupo de trabajo, que sirvieron de base para el desarrollo de esta tesis, se centraron en el estudio de los contactos focales, la importancia del entorno lipídico donde se ensamblan, y su modulación por acción de la hormona intrarenal bradiquinina.

Dado que el primer objetivo general de la presente tesis es profundizar el estudio de la regulación fisiológica de vinculina en los túbulos colectores de la papila, el primer capítulo se centra en caracterizar el modelo de estudio analizando las características de las células de túbulo colector de papila renal en las condiciones de cultivo que fueron utilizadas durante el desarrollo de la investigación.

1.1 Caracterización morfológica de las células de túbulo colector en cultivo primario

Como se describió en la sección de materiales y métodos, los cultivos primarios de células del túbulo colector de papila renal se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Stokes *et al* [160]. Una vez extraídas las papilas, se cortaron en pequeños trozos y se disgregaron por acción de la enzima colagenasa. La acción enzimática se corroboró mediante observación microscópica de una gota de la suspensión. Como resultado de este procesamiento se liberaron estructuras tubulares intactas de la papila renal que corresponden a los túbulos colectores (Figura 12).

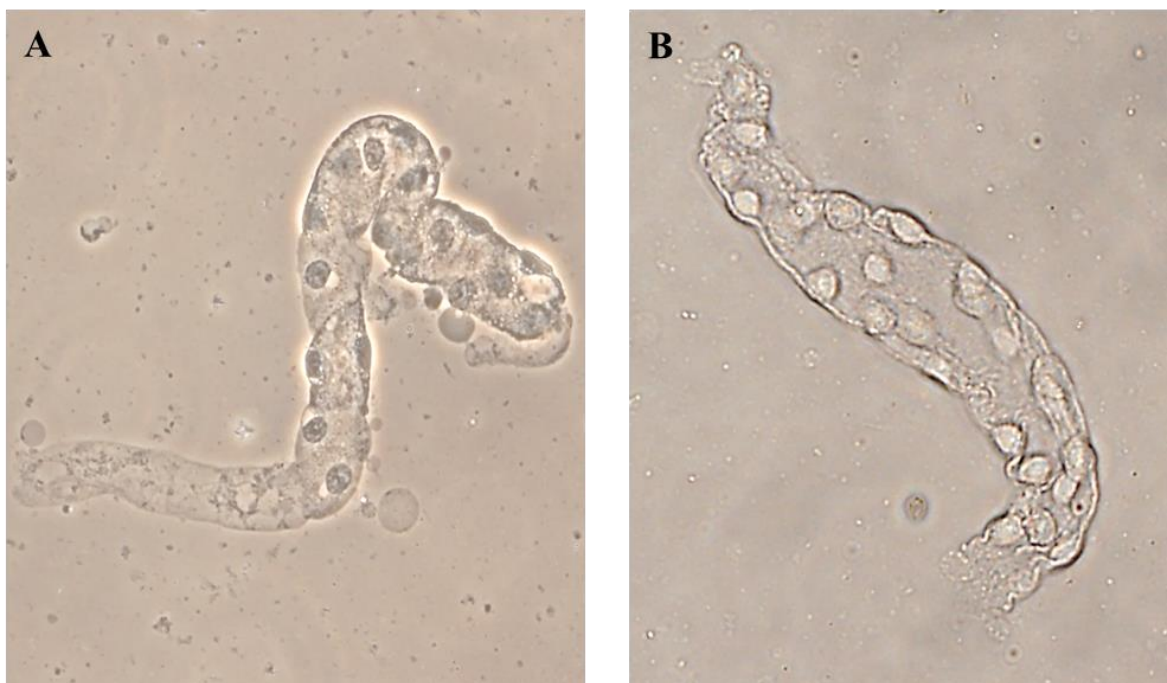


Figura 12- Túbulos colectores aislados de la papila renal. Suspensión de túbulos colectores aislados de la papila renal luego de centrifugar las muestras a baja velocidad. (A) y (B) Imágenes de microscopía de contraste de fases que corresponden a diferentes campos. Aumento: 400X más zoom 1.6X

El seguimiento del crecimiento celular se realizó a través de visualización de las colonias cada 24 hs. Desde el punto de vista histológico, los túbulos colectores poseen un epitelio cúbico simple con un núcleo central. Como se observa en la Figura 13, a las 96 hs de cultivo, las células se organizan en colonias de gran tamaño, y se mantienen estrechamente unidas. Poseen en su mayoría una apariencia clara, los núcleos exhiben una cromatina laxa, y algunas células presentan vesículas citosólicas.

Sobre la base de estas observaciones, las características de las células en el cultivo primario son concordantes con las descritas previamente por Stokes *et al* [160].

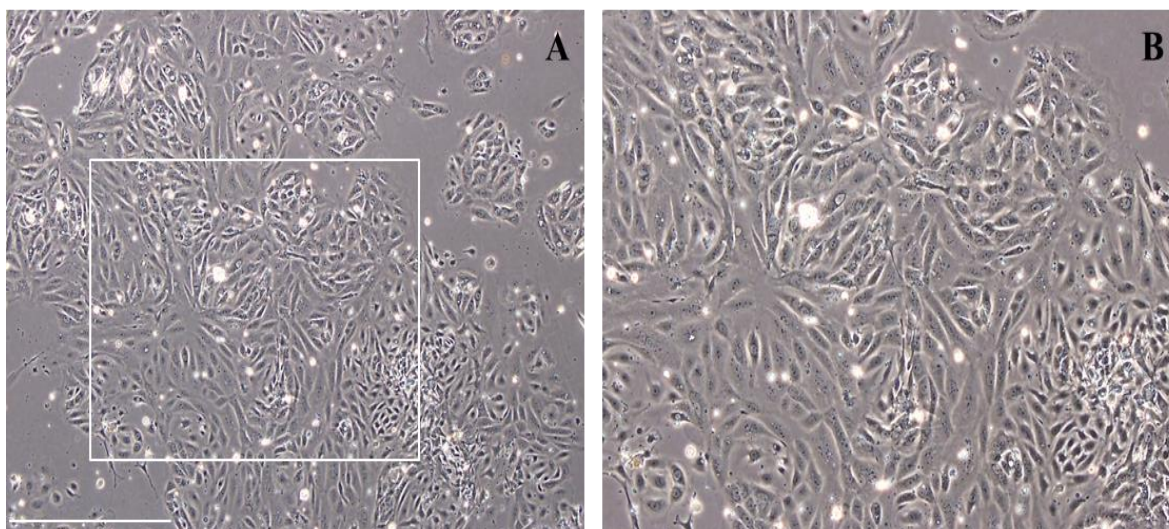


Figura 13-Cultivo primario de células del túbulo colector de 96 hs de crecimiento. Imágenes de microscopía de contraste de fase. **A)** Campo captado con objetivo de 10X. El recuadro indica la zona elegida y ampliada para obtener una imagen de mayor tamaño. **B)** Zona elegida en la imagen (A) tomada con objetivo de 10X más zoom 1.6X. Se observan células claras formando una monocapa o lámina celular. La barra en la imagen representa 500 μm .

1.2 Caracterización fenotípica de las células de túbulo colector en cultivo primario

1.2 a) Caracterización de las células de túbulo colector mediante la unión de lectinas específicas

La adquisición o pérdida secuencial de glicoconjugados puede considerarse como un marcador del estado de diferenciación, y para identificar células en tejidos complejos como son los túbulos renales. El uso y aplicación de las lectinas alcanzó gran importancia en las décadas de los '70 y '80 en donde la heterogeneidad celular de los tejidos no se podía llegar a comprender completamente sólo con técnicas histoquímicas [169, 170]. Por este motivo, se analizó el grado de pureza y de diferenciación de las células de túbulo colector en cultivo según la capacidad de unir lectinas específicas. Las más ampliamente utilizadas para este fin son la lectina *Dolichos Biflorus* Agglutinin (DBA) y la lectina *Griffonia Simplicifolia* Lectin I (BSL-I). La lectina DBA se une específicamente a N-acetilgalactosamina- α 1,3 N-acetilgalactosamina, que se halla presente en células de túbulo colector pero no en las células del intersticio renal.

Contrariamente, la lectina BSL-I se une específicamente a α -N-acetilgalactosamina- α D galactosa que se halla presente en la membrana de las células intersticiales y no en los túbulos colectores [160, 171, 172]. Durante su maduración, las células del túbulo colector adquieren el glicoconjugado que reconoce DBA y pierden el que reconoce BSL-I [160, 171, 172, 173]. Transcurridas las 96 hs de cultivo, se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica de doble marcado combinando ambas lectinas, y posteriormente, la lectina DBA con un anticuerpo dirigido contra citoqueratina 7 (CK7), la cual forma parte de los filamentos intermedios y se expresa en células de estirpe epitelial; y con un anticuerpo dirigido contra vinculina, la cual forma parte de las uniones adherentes (UA) y de los contactos focales. Como se mencionó, la formación de las UA resulta fundamental en la adquisición y en el mantenimiento de la estructura y polarización de la célula epitelial [17, 18], como así también, de la arquitectura tisular [19, 20].

Se observó que las células que unen DBA con gran intensidad también expresan CK7, y vinculina en las UA, pero no se tiñen con BSL-I (Figura 14). En la Figura 14A, A' y A" se observa que la mayoría de las células presentan marcación positiva para DBA pero no para BSL-I. Las células DBA positivas con marcación intensa, corresponden a células totalmente diferenciadas provenientes de los túbulos colectores aislados. En la Figura 14B, B' y B" se observa que todas las células expresan al marcador epitelial CK-7, pero la marcación con DBA no es homogénea. De forma similar, en la Figura 14C, C' y C" se observa que todas las células expresan vinculina en el citosol, formando parte de los contactos focales y distribuyéndose de forma homogénea en los bordes de las células, reflejando la integridad de las UA. Pero la marcación con DBA tampoco es homogénea. Si bien algunas presentan una tinción intensa para DBA otras tienen una marcación débil. Estas últimas, que a las 96 hs de cultivo representan una minoría, corresponden a células *en tránsito* a la diferenciación. Se trataría de células jóvenes que aún no expresan los glicoconjugados típicos de las células del TC totalmente diferenciadas.

1.2 b) Análisis de la presencia del cilio primario

Como se indicó en la introducción, las células de los túbulos colectores totalmente diferenciados desarrollan un cilio primario. Con el objeto de investigar si las células del TC poseen este grado de madurez luego de 96 hs de cultivo, las células fueron inmunomarcadas con un anticuerpo anti-tubulina acetilada, que es una proteína que conforma al cilio primario. Como se observa en la Figura 15, la mayoría de las células dan resultado positivo (Figura 15B-flechas), reflejando el alto grado de madurez de las células en el cultivo.

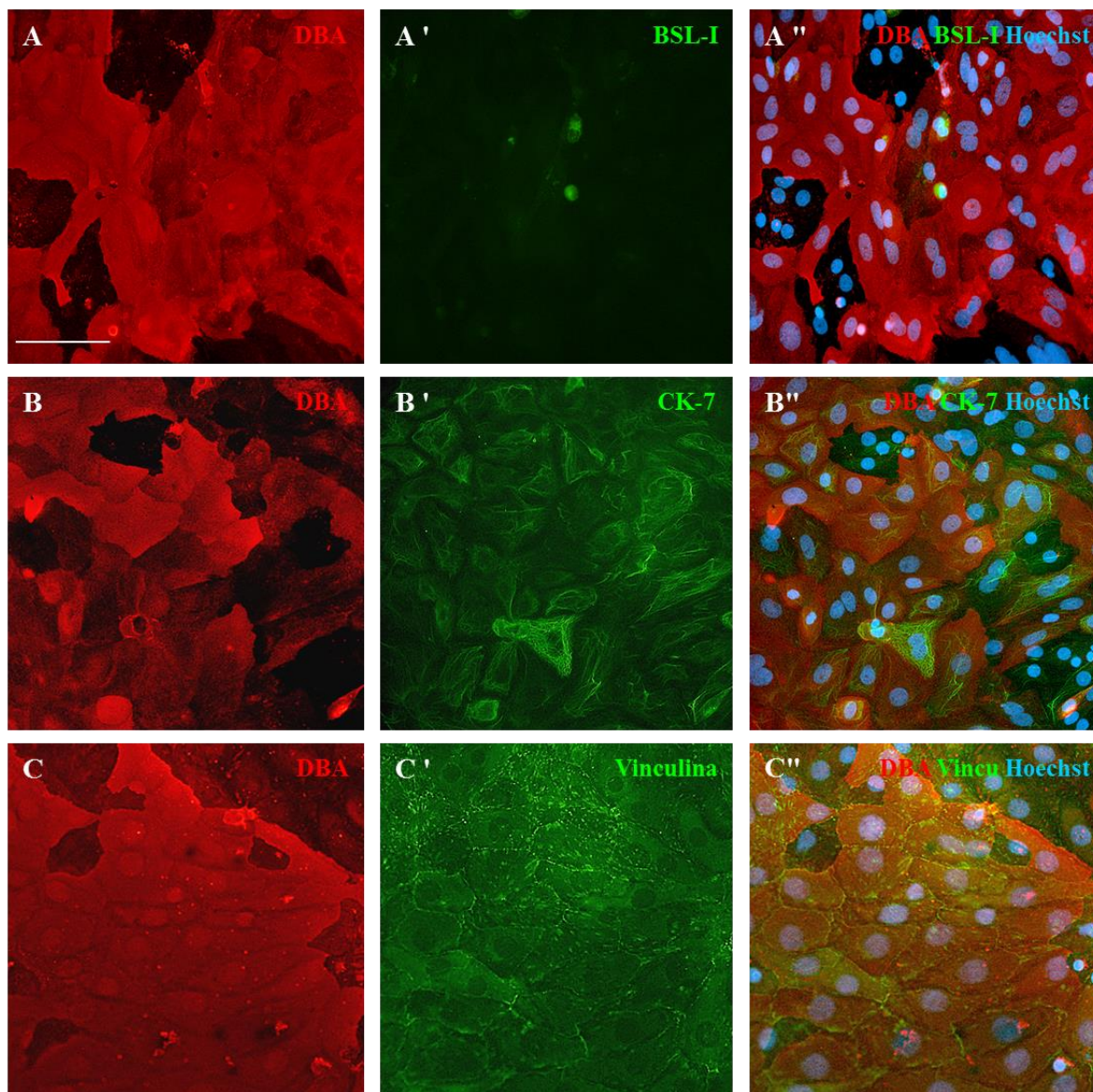


Figura 14-Análisis fenotípico de las células de túbulo colector en cultivo primario de 96 hs de crecimiento. Las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas citoqueratina-7 (CK7) y vinculina (verdes), y con las lectinas DBA (rojo) y BSL-I (verde). Los núcleos se colorearon con Hoechst 33258 (azul). Se observan dos poblaciones celulares: células totalmente diferenciadas con marcación intensa para DBA que no unen BSL-I, que expresan CK-7 y vinculina; y células en proceso de diferenciación con marcación para DBA débil pero que expresan CK-7 y vinculina. La barra representa 100 μ M.

Por lo tanto, los resultados estarían indicando que las células de túbulo colector de papila renal de rata en cultivo primario de 96 hs de crecimiento poseen características morfológicas y fenotípicas compatibles con un tejido renal maduro. Esto se desprende del alto grado de asociación de las células, de la expresión del marcador de estirpe epitelial, la formación de uniones adherentes, de la unión a lectinas, y del desarrollo de un cilio primario.

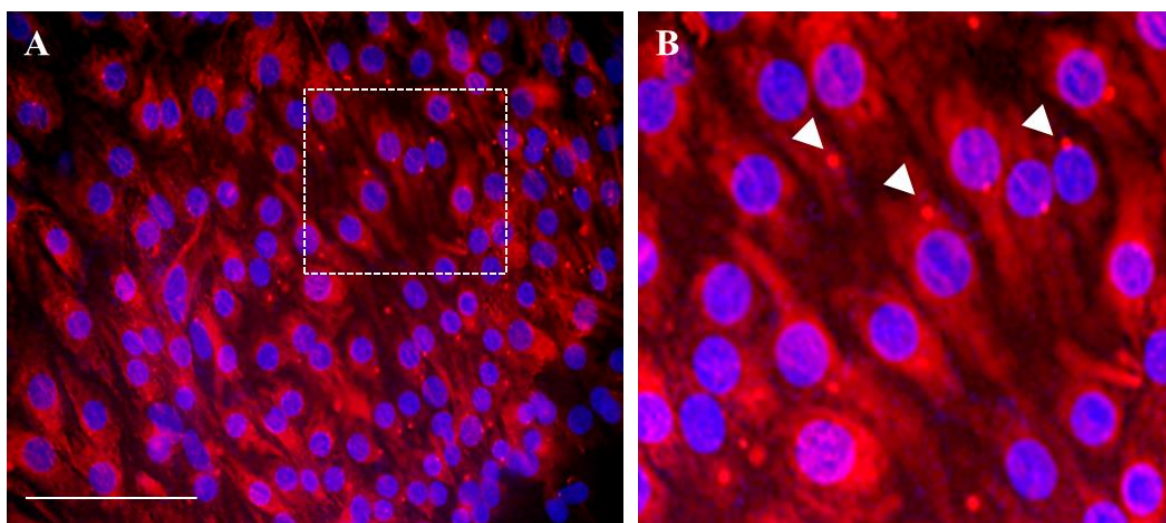


Figura 15- Análisis de la presencia del cilio primario. Las células de túbulo colector en cultivo primario fueron inmunomarcadas con un anticuerpos dirigido contra tubulina acetilada (rojo). El recuadro en (A) indica una zona de la colonia amplificada (B) para facilitar la observación de los cilios señalados con puntas de flechas. Los núcleos se colorearon con Hoechst 33258 (azul). La barra representa 100 μ M.

2. EFECTO DE LA BRADIQUININA SOBRE LOS CONTACTOS FOCALES EN CÉLULAS DE TUBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL

Como se mencionó en la introducción, en los últimos años, el grupo de trabajo cuyos resultados permitieron el desarrollo de la presente tesis, ha estudiado el rol que ejerce la hormona intrarenal bradiquinina (BK) sobre los contactos focales (CF). Utilizando como modelo experimental cultivos primarios de células de túbulo colector de papila renal se demostró que esta hormona modula los CF al inducir una reestructuración de los mismos de manera reversible, movilizandovinculina -pero no talina- por un mecanismo dependiente de la PLC β . Se observó que a tiempos cortos de estimulación con BK (1 y 5 min) se produce una disminución del número de CF inmunomarcados con vinculina por célula, y a tiempos prolongados de estimulación (10 min) estos se recomponen [75]. Además, la reestructuración de los CF está acompañada de la formación de vesículas en el citosol que contienen vinculina y fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) [146] (Figura 16). Estas vesículas, mediante una vía polarizada de exocitosis, transportan vinculina a los sitios de armado de los CF, por un mecanismo que depende de la integridad del citoesqueleto de actina [146]. Estos resultados motivaron a realizar la caracterización de estas vesículas con el fin de plantear un modelo de distribución intracelular de vinculina en este tipo celular.

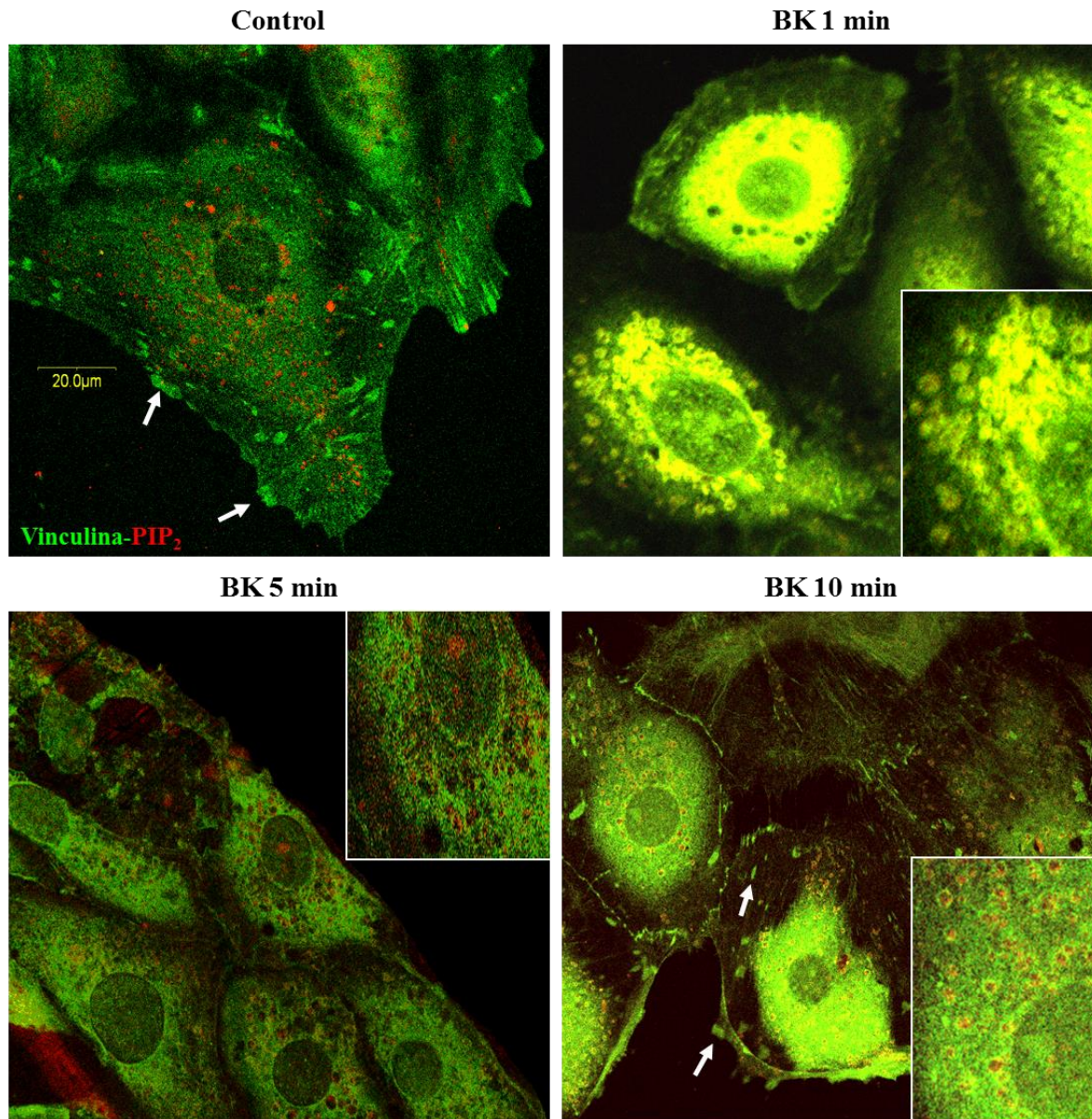


Figura 16- Efecto de la bradiquinina (BK) sobre los contactos focales (CF) en células de túbulo colector de papila renal. Células de túbulo colector de papila renal en cultivo primario estimuladas con BK durante 1, 5 y 10 min, inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos contra vinculina y PI(4,5)P₂, y posterior análisis por microscopía confocal. En las células control, las flechas señalan a los CF. Al estimular las células durante 1 y 5 min con BK la cantidad de CF disminuye. A los 10 min de estimulación se observan vesículas más dispersas en el citosol, más próximas a la membrana, y la formación de CF, indicados con flechas. Los insertos muestran zonas amplificadas para facilitar la observación de la gran cantidad de vesículas en el citosol. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos. La barra representa 20 μm.

3. ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA EN CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL

3.1 Aislamiento de las vesículas que contienen vinculina

Esta describe que la vinculina forma parte de un pool citosólico y de un pool citoesquelético, y este último corresponde a la vinculina presente en los contactos focales (CF) y en las uniones adherentes (UA) [80, 86]. Clásicamente, el pool citosólico corresponde a la conformación autoinhibida soluble de la proteína [58]. Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en las células de túbulo colector de la papila renal, este pool citosólico está formado además por vinculina asociada a vesículas [146]. En este tipo celular, a tiempos cortos de estimulación con BK, la mayor parte de la vinculina se disipa de los CF y se acumula en la región perinuclear. A los 10 min, los CF inmunomarcados con vinculina se rearmen. Se observa claramente en el citosol de las células la presencia de vesículas conteniendo vinculina (Figura 16). Con el objeto de estudiar en profundidad las características bioquímicas de dichas vesículas, se puso a punto un protocolo de aislamiento y purificación de las mismas, basado en métodos inmunomagnéticos, cuyo esquema se halla representado en la Figura 8 en el capítulo de materiales y métodos. Tal como se detalla en el capítulo de materiales y métodos, se utilizaron esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra vinculina. Como material de partida, se utilizó el sobrenadante postnuclear (SPN) o la fracción microsomal obtenida de cortes de papila renal de 0.5 mm de espesor incubados con BK 1 μ M durante 5 minutos.

En una primera etapa, se analizó la presencia de vinculina en la fracción microsomal y citosólica. También se estudió la presencia de la enzima ATPasa Na^+/K^+ como marcador específico de la fracción microsomal para validar la separación de las fracciones subcelulares. Como puede observarse en la Figura 17, vinculina se encuentra presente tanto en la fracción microsomal (M) como en la citosólica (C), mientras que la ATPasa Na^+/K^+ casi no se detecta en la fracción citosólica.



Figura 17- Distribución de vinculina en la fracción microsomal (M) y citosólica (C). Western Blot mostrando la distribución de vinculina en ambas fracciones subcelulares obtenidas de células del túbulo colector de papila renal según el protocolo experimental descrito en el capítulo de materiales y métodos. Se muestra una imagen correspondiente a un resultado representativo de tres experimentos.

A continuación, se ensayaron dos protocolos experimentales de aislamiento y purificación provistos por el fabricante: el método directo (D), el cual se aplica cuando los epítopes se encuentran expuestos, y el método indirecto (I), para detectar en la membrana tanto los epítopes expuestos como los no expuestos. Luego de someter el tubo al imán, se obtuvieron dos fracciones: la *fracción unida* que contiene las vesículas de vinculina unidas a las esferas magnéticas, y la *fracción no unida* que corresponde al sobrenadante. Para verificar el éxito del aislamiento se analizó por Western Blot la presencia de vinculina en la *fracción unida*. Como se observa en la Figura 18, se obtuvo una señal positiva luego de aplicar ambos protocolos, lo que sugiere que la vinculina podría estar expuesta en la cara citosólica de las vesículas. Como control positivo, para realizar el Western Blot se sembró una alícuota de la fracción microsomal (M) utilizada como material de partida. Debido a la rapidez y eficiencia de aislamiento, se decidió utilizar el método directo para el resto de los análisis.

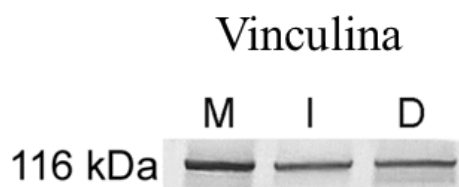


Figura 18- Comparación de los métodos directo (D) e indirecto (I). Western Blot mostrando el resultado del inmunoaislamiento de vesículas que contienen vinculina por ambos métodos, utilizando como material de partida la fracción microsomal (M) obtenida de células del túbulo colector de papila renal según el protocolo experimental descrito en el capítulo de materiales y métodos. Se muestra una imagen correspondiente a un resultado representativo.

A continuación, se aislaron las vesículas utilizando como material de partida el sobrenadante postnuclear (SPN), y se analizó mediante Western Blot la presencia de vinculina tanto en la *fracción unida* (Bound-B) como en la *no unida* (Not Bound-NB) a las esferas magnéticas. Como era de esperar, vinculina fue detectada tanto en el SPN como en la fracción unida, pero también se observó una señal positiva en la fracción no unida (Figura 19A). Esta señal muy probablemente corresponda al gran pool citosólico de vinculina libre preexistente, no asociado a vesículas, que se observa claramente en la Figura 17.

Como control de especificidad del método, se utilizó para recubrir las esferas magnéticas un anticuerpo irrelevante, como lo es el anticuerpo monoclonal anti-ciclina D. En el Western Blot de la Figura 19B se observa la falta de señal positiva en la calle correspondiente al producto de este aislamiento (Bi), en contraste con la banda que aparece cuando se utilizó un anticuerpo anti-vinculina (B), lo que refleja la especificidad del método de aislamiento.



Figura 19- A) Análisis de las fracciones *unida* (B) y *no unida* (NB) a las esferas magnéticas. Western Blot que muestra la presencia de vinculina en ambas fracciones utilizando como material de partida (SM) el sobrenadante posnuclear obtenido de células del túbulo colector de papila renal según el protocolo experimental descrito en el capítulo de materiales y métodos. Se muestra una imagen correspondiente a un resultado representativo. **B) Análisis de la especificidad del método de aislamiento basado en esferas inmunomagnéticas.** Western Blot que muestra la ausencia de vinculina en la calle correspondiente al producto del aislamiento utilizando esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti ciclina-D (Bi). Las señales positivas corresponden a la vinculina presente en la fracción microsomal (M) que se usó como material de partida, y a la presente en las vesículas cuando se utilizó en el aislamiento un anticuerpo anti vinculina (B) para recubrir las esferas magnéticas. Se muestra una imagen correspondiente a un resultado representativo.

3.2 Análisis morfológico de las vesículas por microscopía electrónica

Con el objeto de utilizar un criterio morfológico para corroborar la eficiencia y la especificidad del método inmunomagnético, se realizó un análisis mediante microscopia electrónica de transmisión de la fracción *unida* a las esferas magnéticas. Se analizaron los productos del inmuoaislamiento en dos situaciones experimentales distintas: utilizando esferas en las cuales se omitió el recubrimiento con el anticuerpo, y esferas recubiertas con el anticuerpo anti vinculina.

En la imagen de la Figura 20a se observa la ausencia de estructuras vesiculares asociadas a las esferas magnéticas no recubiertas con anticuerpos. De esta manera se comprobó que las vesículas no se unen a las esferas en forma inespecífica. Por el contrario, en las imágenes de las Figuras 20b y 20c se observa claramente estructuras de membrana de pequeño tamaño asociadas a las esferas recubiertas con el anticuerpo anti vinculina. Estas estructuras corresponden a las vesículas aisladas por el método directo. Las vesículas inmuoadsorbidas a la superficie de las esferas magnéticas son pequeñas y su contenido es poco electrodens.

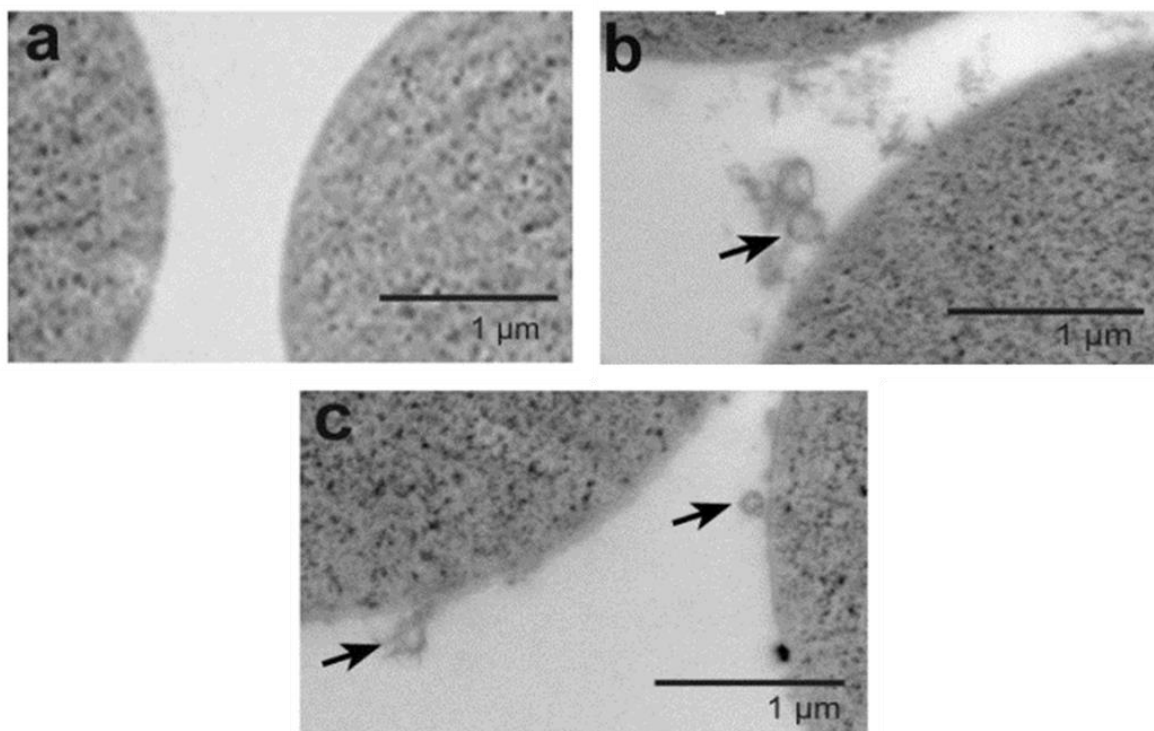


Figura 20- Caracterización morfológica de las vesículas inmunoaisladas. Las muestras se prepararon para microscopía electrónica utilizando los procedimientos estándares descritos en el capítulo de materiales y métodos. En las microelectrografías se muestran las fracciones *unidas* luego de utilizar: (a) esferas magnéticas en donde el anticuerpo primario fue omitido, y (b-c) esferas recubiertas con anticuerpo anti vinculina. Se muestra la vista parcial de las esferas magnéticas seccionadas. Barra, 1 µm (10.000X)

3.3- Estudio de la orientación de la vinculina en la membrana de las vesículas

De acuerdo a los resultados obtenidos en la puesta a punto de los métodos de inmunoaislamiento directo e indirecto, la vinculina parecería estar asociada a la cara citosólica de la membrana de las vesículas. Para corroborar esta hipótesis, y definir la orientación de la proteína en la membrana, se realizó el ensayo de protección a la hidrólisis por tripsina (proteasa). Para ello se utilizó como material de estudio la fracción microsomal aislada de cortes de papila renal según se detalla en el capítulo de materiales y métodos. Esta fracción se incubó con concentraciones crecientes de tripsina, con el agregado o no de Tritón X-100. Mediante ultracentrifugación se obtuvo un pellet, que contiene las proteínas resistentes a la tripsina, y un sobrenadante. La presencia de vinculina se analizó por Western Blot. En contraste con las bandas de vinculina presentes en las muestras tratadas con PBS, no se observa señal positiva en las muestras tratadas con ambas concentraciones de tripsina, incluso en ausencia de Tritón X-100 (Figura 21). Este resultado indica que la vinculina se asocia a la cara citosólica de la membrana vesicular, y por este motivo es sensible a la hidrólisis con tripsina. Para validar el

experimento se utilizó como control un anticuerpo dirigido contra el dominio externo de la subunidad β de la ATPasa Na^+/K^+ . Esta enzima es una proteína transmembrana. De forma similar al resultado obtenido en el análisis de vinculina, se observa señal positiva para la enzima en las muestras tratadas solo con PBS (Figura 21).

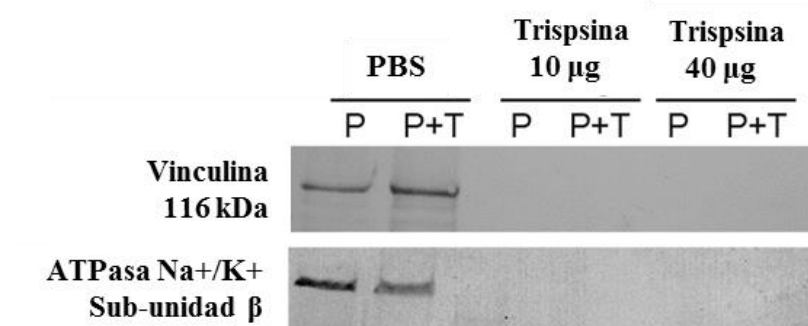


Figura 21- Ensayo de protección a la hidrólisis por tripsina. Las fracciones microsomales fueron incubadas con concentraciones crecientes de tripsina, en presencia o no de Tritón X-100 según el protocolo explicado en el capítulo de materiales y métodos. La presencia de vinculina y de la subunidad β de la ATPasa Na^+/K^+ fueron analizadas mediante Western Blot. Los resultados corresponden a uno de tres experimentos independientes. (P) pellet, (T) Tritón X-100

3.4 Estudio de la naturaleza de asociación de vinculina con la membrana de las vesículas

En general, las proteínas interactúan con las membranas de tres maneras distintas. Pueden estar asociadas a las membranas de forma integral (proteínas transmembrana), unidas covalentemente a un lípido, o de forma periférica a través de interacciones iónicas u otras no covalentes débiles. En general, las proteínas periféricas pueden ser removidas de la membrana con soluciones de gran fuerza iónica (soluciones salinas concentradas), que rompen los enlaces iónicos. A diferencia de las proteínas integrales, la mayoría de las proteínas periféricas son solubles en soluciones acuosas y no requieren disolución con detergentes, como sí lo requieren las proteínas integrales.

Con el objeto de estudiar la naturaleza de la asociación de vinculina a la membrana, se realizaron ensayos bioquímicos de extracción de proteínas con soluciones de fuerza iónica creciente, y de pH alcalino, y ensayos de partición con Tritón X-114. Se utilizó como material de estudio la fracción microsomal aislada de cortes de papila renal según se detalla en la sección de materiales y métodos. Se incubó esta fracción con PBS, soluciones de alto contenido salino (1.0 – 3.0 M KCl) o pH elevado (0.5 y 0.1 M Na_2CO_3 pH 10), y por ultracentrifugación

se obtuvo un pellet, donde se ubican las proteínas resistentes a la extracción, y un sobrenadante, que contiene las proteínas sensibles a la extracción. La presencia de vinculina se analizó por Western Blot. En la Figura 22A se muestran los resultados del tratamiento de la fracción microsomal con soluciones alcalinas de KCl. Se observa la banda correspondiente a vinculina en el pellet (P) y en el sobrenadante (S) de las muestras tratadas con PBS (control). Pero se observa en el sobrenadante, que a mayor fuerza iónica, es mayor la cantidad de vinculina extraída de la membrana de las vesículas, hecho que se ve reflejado por la intensidad creciente de las bandas. Se obtuvo un resultado similar cuando se sometió a las muestras a concentraciones crecientes de Na_2CO_3 . Se observa que una concentración baja como de 0.5 M resultó ser suficiente para provocar la liberación de vinculina de la membrana (Figura 22B). Estos resultados reflejan el efecto del cambio de pH en la desestabilización de las uniones electrostáticas entre las proteínas y las membranas. La gran sensibilidad a la acción de soluciones de alta fuerza iónica y a cambios de pH sugiere que el tipo de asociación de la vinculina con la membrana de las vesículas es de tipo electrostática.

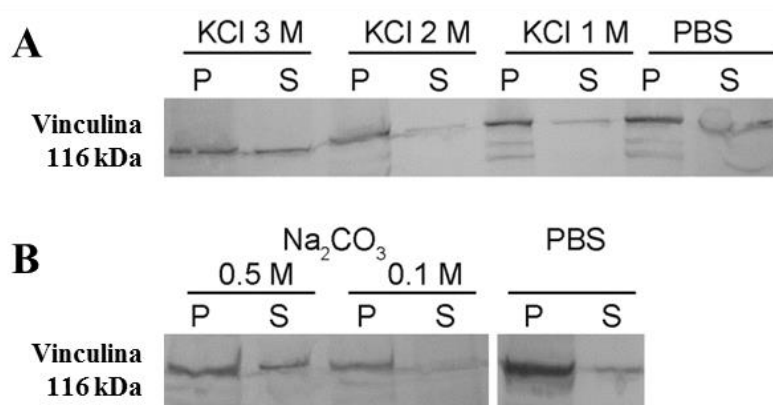


Figura 22- Características de la asociación de vinculina a la membrana de las vesículas. En (A) se muestra la extracción con soluciones de alta fuerza iónica y en (B) con pH alcalino de la fracción microsomal obtenida según el protocolo explicado en el capítulo de materiales y métodos. La presencia de vinculina fue analizada mediante Western Blot. Los resultados corresponden a uno de tres experimentos independientes. (P) pellet, (S) sobrenadante. Se muestran diferentes partes de la misma membrana.

Para completar el estudio de la naturaleza de la asociación de vinculina a la membrana de las vesículas se aplicó un ensayo de partición de fases con Tritón X-114 [163]. Las soluciones de Tritón X-114 son homogéneas a 0°C y se separan en dos fases (una acuosa y una detergente) por encima de 20°C (Cloudy point precipitation). Las proteínas periféricas hidrosolubles se ubican en la fase acuosa, y las proteínas integrales anfipáticas, en la fase detergente. Se utilizó como material de estudio la fracción microsomal aislada de cortes de papila renal según se detalla en la sección de materiales y métodos. Como control positivo de proteína integral de membrana se usó el receptor de transferrina (RTf). La presencia de vinculina y de RTf se analizó por Western Blot. Los resultados indican que la vinculina se ubica exclusivamente en la

fase acuosa, mientras que su presencia en la fase de detergente fue casi indetectable. Contrariamente, la señal de RTf que se detecta en la fase detergente es mucho mayor a la presente en la fase acuosa (Figura 23).



Figura 23- Ensayo de partición de fases con Tritón X-114. Se muestra el resultado del ensayo de partición de fases con Tritón X-114 de la fracción microsomal (M). Se analizaron volúmenes iguales de la fase acuosa (Aq) y de la fase detergente (Det) para detectar vinculina y el receptor de transferrina (RTf). Los resultados corresponden a uno de tres experimentos independientes.

3.5- Caracterización bioquímica de las vesículas que contienen vinculina

3.5-a) Análisis de la presencia de marcadores del compartimento endosomal de reciclaje

Como se ha mencionado, la BK ejerce un efecto modulador sobre los contactos focales (CF) de células del túbulo colector de la papila renal, movilizandovinculina por un mecanismo que involucra la hidrólisis de PIP_2 por activación de la PLC [75]. Este proceso ocurre con la aparición simultánea en el citosol de vesículas que contienen vinculina, PIP_2 y el receptor de transferrina (RTf) [146]. Las Rab GTPasas se asocian específicamente con ciertas organelas. Rab 5 está presente en los endosomas tempranos [139, 143], y Rab 11 en el compartimiento de reciclaje [136, 139]. Puesto que después de la internalización, el RTf pasa por los endosomas tempranos y de reciclaje [174], ambas moléculas son usadas con frecuencia como herramientas para visualizar este compartimiento.

En una primera etapa realizamos Western Blots para analizar la presencia de proteínas involucradas en el tráfico vesicular, en las vesículas aisladas mediante el método inmunomagnético. Teniendo en cuenta que se ha descrito la participación de Rab 11 en el reciclaje de transferrina [175], y que Rab 5 se localiza en los endosomas tempranos, se estudió si Rab 5 y Rab 11 coprecipitan con vinculina durante el inmunoaislamiento.

Es sabido que los fosfoinosítidos cumplen un rol importante en la definición de la identidad de las membranas [175], y que el PIP_2 es una molécula esencial para que vinculina participe en la formación de los CF [58]. Además, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en las células del túbulo colector de la papila renal, la disminución de la producción de PIP_2 altera el reclutamiento de vinculina hacia los CF [113, 114]. Por lo tanto, utilizando un

anticuerpo específico dirigido contra PIP₂ se evaluó la presencia del fosfoinosítido en las vesículas inmunoaisladas. Como control negativo (C) se utilizaron esferas no recubiertas con el anticuerpo anti-vinculina. Se comprobó que además del RTf, las vesículas contienen Rab 5 y Rab 11 (Figura 24). Estos resultados sugieren que las vesículas que transportan vinculina forman parte del compartimiento endosomal de reciclaje. También se observó una banda de ~116 kDa, que corresponde a PIP₂ unido a vinculina. No se detectó señal positiva en el control negativo de las muestras analizadas (Figura 24).

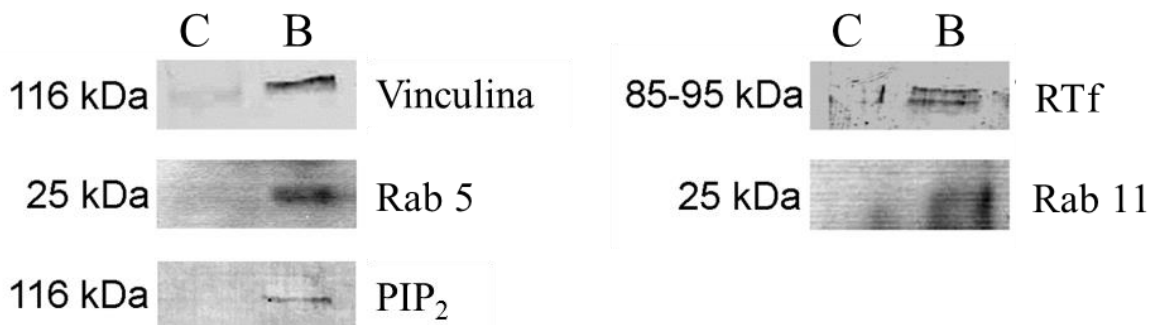


Figura 24- Análisis bioquímico de las vesículas. Las vesículas unidas a las esferas magnéticas (Bound: B) se analizaron mediante Western Blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos dirigidos contra las proteínas indicadas. Como control negativo (C) se usaron esferas magnéticas donde se omitió el anticuerpo anti-vinculina.

3.5-b) Análisis de la presencia de proteínas de los contactos focales en las vesículas aisladas

Como se describió en los antecedentes que dieron lugar al desarrollo de este trabajo de tesis, en las células de túbulo colector de papila renal, la vinculina se asocia a talina en los CF que se localizan en los microdominios DRM de membrana [113, 114], y después del tratamiento con BK, mientras que la vinculina se disipa de los CF, la talina permanece asociada a la membrana plasmática [75]. También se ha descrito que este proceso ocurre con la aparición simultánea en el citosol de vesículas que contienen vinculina, PIP₂, el receptor de transferrina, y proteínas que participan en la vía endosomal de reciclaje, Rab 5 y Rab 11. Por lo tanto, es de esperar que la molécula de talina no se halle presente en las vesículas que contienen vinculina. Otra proteína que cumple un rol importante y forma parte de los CF es paxilina [176]. Con el fin de investigar si las vesículas contienen talina y paxilina, se aislaron por el método inmunomagnético vesículas conteniendo vinculina, utilizando como material de partida el sobrenadante posnuclear (SPN) según el protocolo explicado en la sección de materiales y métodos. Como control positivo de la presencia de ambas proteínas se utilizó la fracción microsomal. En el Western Blot se sembró una alícuota de la fracción *unida* (que contiene las vesículas) y *no unida* que se obtienen al aplicar el protocolo de inmunoaislamiento. Como se

observa en la fracción de vesículas *unida*, no se obtuvo señal positiva para ninguna de las proteínas (Figura 25). Para corroborar este resultado, se duplicó la cantidad de proteínas sembradas de la fracción de vesículas, obteniendo similar resultado. En el caso de la fracción *no unida*, la falta de señal positiva para talina y paxilina no se debió a una dilución de las mismas en el volumen de muestra analizado, dado que si se pudo detectar la presencia de vinculina en las mismas condiciones experimentales (Figura 19A). Es probable que la señal negativa se deba al hecho de que cuando talina y paxilina se encuentran libres en el citosol, son rápidamente degradadas por la enzima calpaína [177] y por esta razón no pudieron ser detectadas en el Western Blot.



Figura 25- Análisis de la presencia de talina y paxilina en las vesículas que contienen vinculina. Como material de partida para el inmunoadsorbimiento de las vesículas se utilizaron 200 μ g de proteínas del sobrenadante postnuclear (SPN). Como control positivo se sembraron alícuotas de la fracción microsomal (M) y del SPN que se utilizó como material de partida para el aislamiento de las vesículas, de la fracción de vesículas unida a las esferas magnéticas (B), y de la fracción no unida (NB). Se muestra un Western Blot representativo de tres experimentos independientes.

En resumen, la presencia en las vesículas de señales positivas para el RTf, Rab 5 y Rab 11, al igual que para PIP_2 asociado a vinculina, sugiere que en el proceso de internalización de vinculina, inducida por la acción de BK, participan los endosomas tempranos, que contienen Rab 5, y el compartimiento de reciclaje endosomal, que contiene Rab 11 y el RTf. La ausencia en las vesículas, tanto de talina como de paxilina, se corresponde con la selectividad de BK de inducir la movilización de vinculina, y no del resto de las proteínas del CF.

3.5 -c) Caracterización de las vesículas mediante espectrometría de masa

Para realizar una caracterización más detallada del contenido de las vesículas, se implementó una estrategia experimental para aislar una cantidad de vesículas adecuada para ser analizada mediante espectrometría de masa. Para ello, partiendo de cortes de papila renal previamente incubados con BK, se aplicó un protocolo de centrifugación diferencial, del cual se obtuvo una

fracción de membranas de alta densidad (*High Density-HD*), y una fracción de membranas de baja densidad (*Low Density-LD*). De acuerdo a la literatura, esta última fracción es libre de membrana plasmática [178]. Para el inmunoaislamiento de vesículas se utilizó como material de partida la fracción de membranas de baja densidad (*Low Density-LD*). En la Figura 26A se muestra un gel de electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) donde se observa el perfil proteico de las diferentes fracciones de membrana obtenidas luego de aplicar el protocolo de centrifugación diferencial explicado en el capítulo de materiales y métodos. Para corroborar la especificidad del aislamiento de las vesículas que contienen vinculina, se analizó mediante Western Blot la presencia de vinculina en alícuotas del sobrenadante de la centrifugación que se realizó a 4000 g por 10 minutos (SN), de las fracciones de alta densidad (HD) y baja densidad (LD), y de las vesículas inmunoaisladas a partir de LD. Se observó una banda positiva para vinculina no solo en las vesículas aisladas, sino también en las fracciones SN, HD y LD, pero con diferente intensidad (Figura 26B). La señal positiva de la fracción HD podría corresponder a vinculina asociada a la membrana plasmática presente en la fracción microsomal, mientras que en la fracción LD representaría a la vinculina asociada a las vesículas.

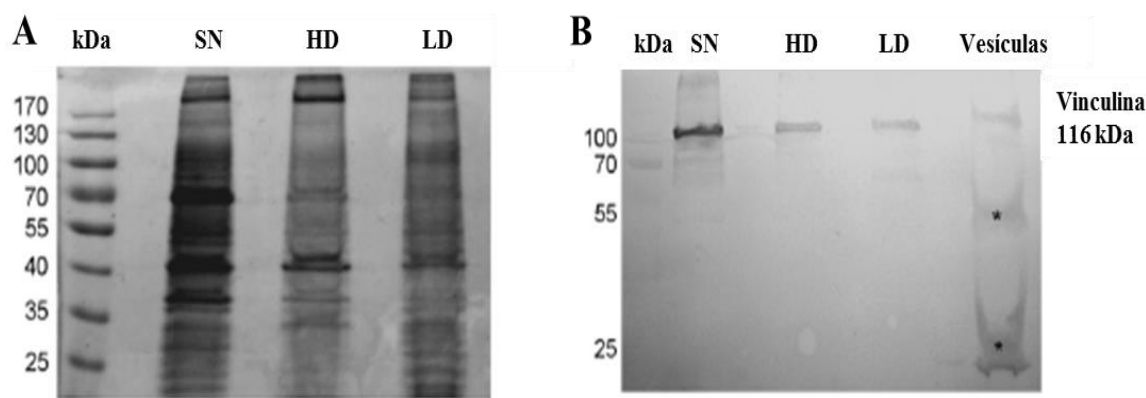


Figura 26- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot mostrando las diferentes fracciones obtenidas a partir de la centrifugación diferencial. **A)** Muestras de sobrenadante (SN) obtenida de la centrifugación a 4000 g durante 10 minutos; fracción de alta densidad (HD) y baja densidad (LD) obtenidas como se describió en la sección de materiales y métodos. Se sembraron igual cantidad de proteínas totales (50 μ g) de cada muestra en geles de SDS-PAGE del 10% y se colorearon con Coomassie blue. **B)** Análisis de la presencia de vinculina en muestras SN, HD, LD y vesículas aisladas de la fracción LD. Se sembraron cantidades iguales de proteínas (40 μ g). Las bandas indicadas con asteriscos corresponden a las cadenas de IgG pesada (55 kDa) y liviana (25 kDa). Se muestra una membrana representativa.

Con el fin de analizar a las proteínas asociadas a las vesículas por espectrometría de masa, las mismas fueron aisladas a partir de la fracción LD y posteriormente sometidas a electroforesis (SDS-PAGE) (Figura 27). Las bandas de color con un peso molecular ≥ 40 kDa fueron cortadas en bloques, y luego cada bloque fue sometido a un proceso de tripsinización en el propio gel y

posterior elusión de los péptidos resultantes. Los péptidos de cada fragmento del gel fueron estudiados mediante espectrometría de masa. Las proteínas fueron identificadas mediante comparación con la base de datos SwissProt utilizando el software BioWorks, versión 3.1. En la Tabla 1 se muestra la lista de proteínas con un peso molecular ≥ 40 kDa, que fueron identificadas a partir de dos o más componentes peptídicos o un péptido y la inspección manual del espectro. Se pudo identificar en las vesículas la presencia de proteínas que participan en el tráfico vesicular como así también proteínas del citoesqueleto, como actina, y varias proteínas relacionadas con actina (α -actinina-4), proteínas motoras de actina (miosina-9) y proteínas de los microtúbulos. Además, las vesículas también contienen proteínas residentes del retículo endoplasmático, consistente con la presencia de vinculina en el retículo endoplásmico rugoso donde se sintetiza. También se detectó la presencia de varias proteínas mitocondriales (sub-unidades alfa y beta de la ATP-sintasa), y proteínas inespecíficas (proteínas heat-shock y albúmina sérica). Probablemente estas últimas solo se asocian a las membranas vesiculares por sus propiedades físico-químicas, pero no participan en el proceso de tráfico vesicular.

Del análisis de los resultados expuestos concluimos que las vesículas que contienen vinculina son heterogéneas e incluyen fragmentos del retículo endoplásmico rugoso.

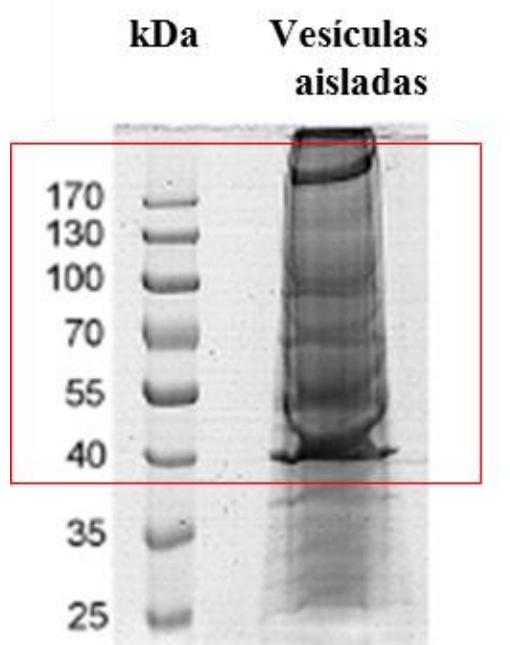


Figura 27- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análisis de las vesículas a través de LC-MS/MS. Las vesículas que contienen vinculina fueron aisladas utilizando el método inmunomagnético a partir de la fracción LD (1000 μ g de proteínas). Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE en geles del 10% y coloreadas con Coomassie blue. Las bandas de color con un peso molecular ≥ 40 kDa (recuadro rojo) fueron cortadas en bloques para la trispsinización en gel y posterior análisis mediante LC-MS/MS.

Tabla 1

Resumen de las proteínas identificadas que se asocian con las vesículas que contienen vinculina en células del túbulo colector de la papila renal. Las bandas de color con un peso molecular ≥ 40 kDa fueron cortadas en bloques, y luego cada bloque fue sometido a un proceso de tripsinización en el propio gel y posterior elusión de los péptidos resultantes. Los péptidos de cada fragmento del gel fueron estudiados mediante espectrometría de masa. Las proteínas fueron identificadas mediante comparación de dos o más componentes peptídicos o un péptido y la inspección manual del espectro utilizando la base de datos SwissProt y el software BioWorks, versión 3.1.

| Proteínas en orden de peso molecular decreciente |
|--------------------------------------------------|
| Miosina-9 |
| Vinculina |
| Proteína Heat shock HSP 90-beta |
| Proteína Heat shock HSP 90-alfa |
| Gelsolina |
| Alfa-actinina-4 |
| ATPasa transicional del retículo endoplasmático |
| Calnexina |
| Albúmina sérica |
| Proteína Heat shock cognado 71 kDa |
| Proteína Heat shock 70 kDa 1A/1B |
| ATP-sintasa subunidad alfa, mitocondrial |
| Tubulina Beta-cadena 4B |
| Tubulina Alfa-cadena 1B |
| Ig Gamma-cadena 1-región C |
| ATP-sintasa subunidad beta, mitocondrial |
| Tubulina Beta-cadena 5 |
| Tubulina alfa-cadena 1A |
| Actina, citoplasmática 1 |
| Actina, citoplasmática 2 |

4. ANÁLISIS DE LA DINÁMICA DE DISTRIBUCIÓN DE LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA

Como se indicó en el capítulo 2 de resultados, la hormona bradiquinina (BK) induce la acumulación perinuclear de vinculina asociada a vesículas al tiempo de 1 min de estimulación, a los 5 min se distribuye en el citosol, y a los 10 min se localiza en la periferia celular, más cercana a la membrana plasmática. Con el objeto de estudiar la dinámica de la formación de las vesículas que contienen vinculina, se realizó un estudio de la distribución intracelular de las mismas analizando el grado de colocalización de vinculina con las proteínas que participan en la vía de reciclaje endosomal (Rab 5 y Rab 11), que como se describió en el capítulo anterior, forman parte de las vesículas. Para ello, se realizaron cultivos primarios que fueron tratados con BK durante 1, 5 y 10 min. Luego, a través de ensayos de doble inmunomarcación, se estudió la colocalización de vinculina con el marcador de los endosomas tempranos (Rab 5) y con el marcador del compartimiento de reciclaje endosomal (Rab 11) [139]. Las células se analizaron mediante microscopía confocal, y el estudio del grado de colocalización se llevó a cabo en dos regiones celulares definidas: en la zona perinuclear y en la zona marginal. Una forma de obtener un valor numérico de la colocalización es a través del *coeficiente de colocalización de Manders* (Manders' Overlap Coefficient–MOC) [166]. El mismo se expresa en valores que van de 0 a 1, por lo que un valor de $MOC \geq 0.7$ es indicativo de colocalización. Para el análisis cuantitativo se tomaron secciones ópticas confocales correspondientes a la región medial de las células desde el lado basal, debido a que es la zona donde se acumula la mayor parte de las vesículas.

En la imagen de superposición de la Figura 28 se detecta la presencia de colocalización entre vinculina y Rab 5 en color amarillo. Esta colocalización puede observarse con mayor facilidad en la imagen de *segmentación*, donde solo se visualizan las zonas de colocalización en color blanco, y en las ampliaciones de zonas de interés indicadas con un inserto. El análisis de MOC demostró un alto grado de colocalización entre vinculina y Rab 5, incluso en los controles (células sin tratar con BK), tanto en las regiones perinuclear como marginal de las células (Figura 28 y Figura 30A).

También, se observó colocalización entre vinculina y Rab 11 en la región perinuclear tanto en las células tratadas con BK como en las células sin tratar (Figura 29). En la región marginal, ambas proteínas solo colocalizan a los 5 y 10 min de estimulación como se muestra en la Figura 30B.

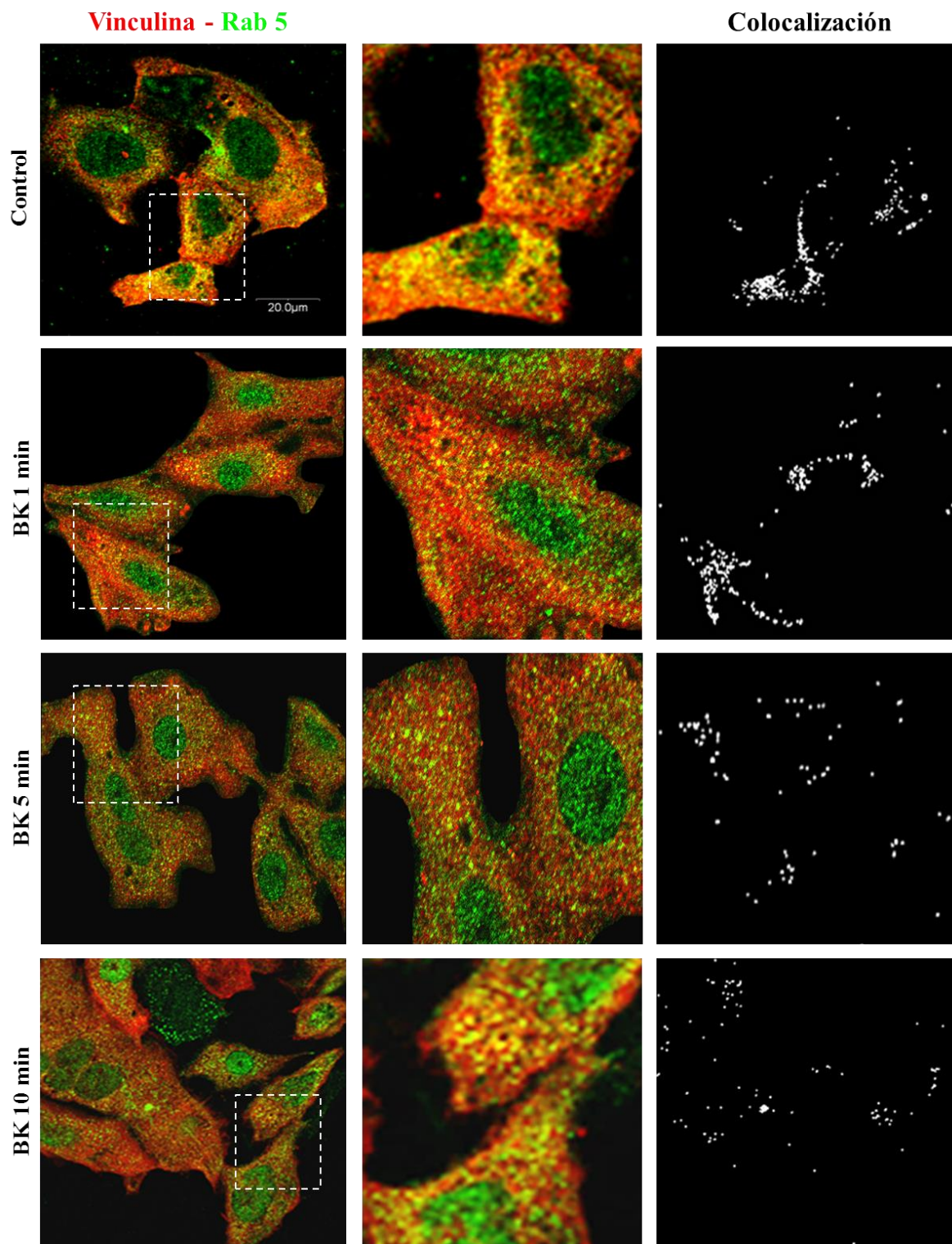


Figura 28- Expresión de Rab 5 en las vesículas que contienen vinculina. Descripción de la figura en página 63.

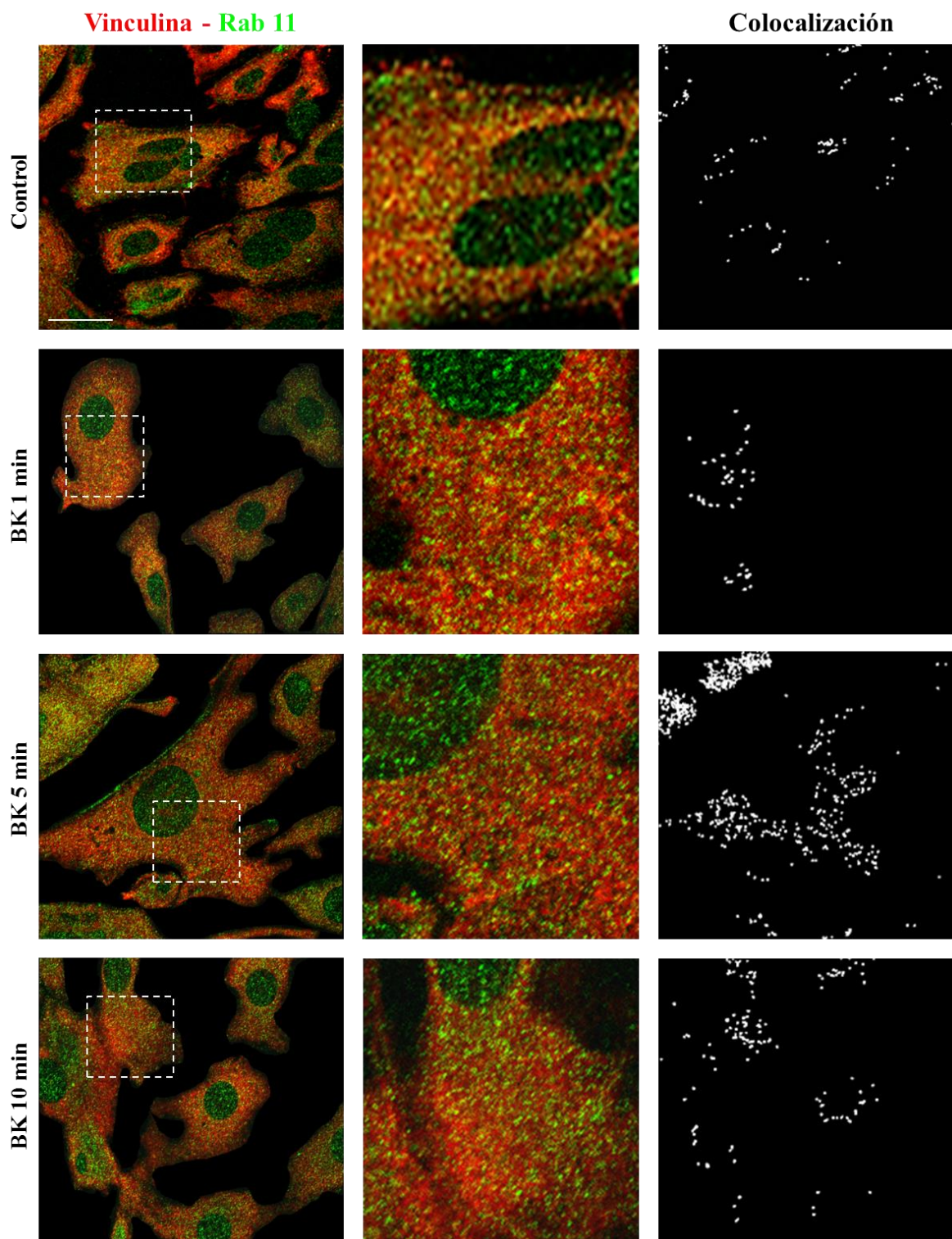


Figura 29- Expresión de Rab 11 en las vesículas que contienen vinculina. Descripción de la figura en página 63.

Figura 28- Expresión de Rab 5 en las vesículas que contienen vinculina. Cultivos sub-confluentes fueron estimulados con BK 1 μ M durante 1, 5 y 10 minutos. Después de la fijación, las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra vinculina (rojo) y Rab 5 (verde). Se muestra la colocalización del doble color entre vinculina y Rab 5 en un plano focal, y en la columna de la derecha las imágenes de segmentación. Los insertos indican zonas de interés ampliadas para facilitar la observación de las vesículas en color amarillo. Obsérvese la movilización de las vesículas desde la zona perinuclear hacia la periferia celular en los tiempos prolongados de estimulación con BK (5 y 10 min). El análisis de colocalización fue realizado utilizando el módulo de colocalización del software Image-Pro Plus. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra: 20 μ m.

Figura 29- Expresión de Rab 11 en las vesículas que contienen vinculina. Cultivos sub-confluentes fueron estimulados con BK 1 μ M durante 1, 5 y 10 minutos. Después de la fijación, las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos contra vinculina (rojo) y Rab 11 (verde). Se muestra la colocalización del doble color entre vinculina y Rab 11 en un plano focal, y en la columna de la derecha las imágenes de segmentación. Los insertos indican zonas de interés ampliadas para facilitar la observación de las vesículas en color amarillo. El análisis de colocalización fue realizada utilizando el módulo de colocalización del software Image-Pro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra: 20 μ m.

Como se mencionó previamente, una forma de obtener un valor numérico de la colocalización es a través del coeficiente de MOC, y el mismo se expresa en valores que van de 0 a 1. Esta correlación considera la fluorescencia en forma total, por lo cual si existe una señal de fluorescencia con mayor intensidad con respecto a la otra, los valores de colocalización son menospreciados [166]. Para evitar esta desviación, se puede utilizar un parámetro que permite evaluar en forma más exacta la colocalización de los focos. Este parámetro se conoce como *coeficientes de superposición K1 y K2* (Overlap coefficient K1 and K2) [166]. El mismo contempla la cantidad de colocalización que es aportada por cada canal o señal (rojo y verde), y se interpreta como la contribución de cada proteína en la colocalización. Con el fin de determinar el grado de contribución de vinculina y Rab 5/Rab 11 al área de colocalización, tanto en las células tratadas como en las no tratadas con BK, se calcularon los coeficientes de superposición K1 y K2. En la Figura 31, el coeficiente K1 (canal rojo) corresponde a vinculina, y K2 (canal verde) a Rab 5 o Rab 11.

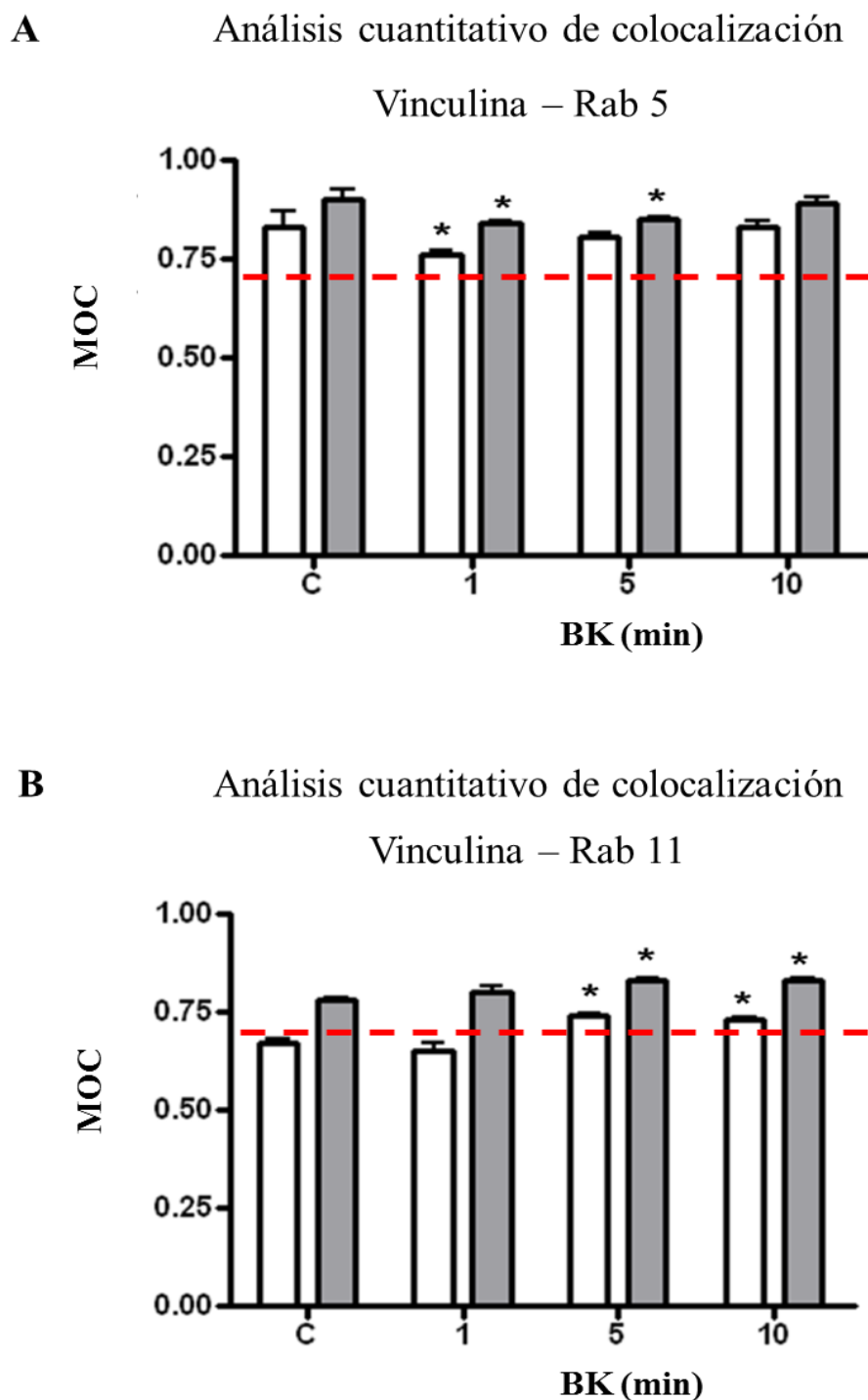


Figura 30- Análisis cuantitativo de la colocalización. Se muestra un promedio del coeficiente de colocalización de Manders (MOC) para estimar el grado de colocalización en **(A)** entre vinculina y Rab 5 y en **(B)** entre vinculina y Rab 11. Las barras grises representan a la zona perinuclear y las barras blancas a la zona marginal para cada tiempo de estimulación con BK. Un valor igual o mayor a 0,7 (indicado por la línea roja) demuestra colocalización entre las proteínas analizadas. Los valores corresponden a la media \pm error estándar (n=3). *Diferencias significativas con respecto al control, $p < 0.05$.

El análisis de los coeficientes K1 y K2 mostró una diferencia en el grado de contribución de vinculina y Rab 5/11 dependiendo del tiempo de estimulación y la región celular analizada. La región marginal de las células sin tratar presentó un grado de contribución máximo para Rab 5 pero un mínimo para vinculina, lo que sugiere que las vesículas Rab 5 positivas contienen pocas moléculas de vinculina unidas (Figura 31A). Después de la estimulación con BK, el grado de contribución de vinculina se incrementó de forma gradual, mientras que el de Rab 5 disminuyó, indicando un enriquecimiento de vinculina en las vesículas Rab5 positivas (Figura 31A). El análisis de la región perinuclear de las células sin tratar mostró un grado de contribución similar tanto de vinculina como de Rab 5. En el tiempo de estimulación de 1 min con BK, el grado de contribución de vinculina se incrementó, mientras que a los 5 min aumentó la contribución de Rab 5, la cual, posteriormente, fue disminuyendo con el tiempo (Figura 31B). Con respecto a las vesículas que contienen Rab 11, en las células no tratadas, el grado de contribución de vinculina fue bajo en ambas regiones, pero en los tiempos de estimulación de 1 y 5 min se incrementó de forma gradual, para finalmente disminuir a tiempos prolongados de estimulación (Figuras 31C-D).

Estos resultados estarían indicando que en condiciones basales, es decir sin estímulo hormonal, existen vesículas Rab 5 y Rab 11 positivas que contienen poca vinculina, y luego de la estimulación con BK, estas vesículas se enriquecen de vinculina, hecho que coincide con la disipación de la proteína de los CF descrita anteriormente.

Con el fin evaluar si la estimulación con BK provoca cambios en la cantidad de Rab 5 y Rab 11 en las vesículas, se realizó el aislamiento inmunomagnético de las mismas a partir del sobrenadante postnuclear (SPN) obtenido de cortes de papila tratadas o no con BK durante 1, 5 y 10 min. La presencia de vinculina, Rab 5 y Rab 11 se analizó por Western Blot. Se observó que luego de la estimulación con BK, la cantidad de Rab 5 en las vesículas disminuyó en comparación con el control sin tratar (C vs BK 1 min, vs BK 5 min, y vs BK 10 min, $p < 0.05$) (Figura 32A). Contrariamente, la cantidad de Rab 11 presente en las vesículas aumentó a los 10 min de estimulación (C vs BK 10 min, $p < 0.05$) (Figura 32B). Además, la cantidad de vinculina presente en las vesículas se incrementó gradualmente con los tiempos de estimulación (C vs BK 1 min, vs BK 5 min, y vs BK 10 min, $p < 0.05$) (Fig. 32C). Por lo tanto, estos resultados indican que la presencia de Rab 5 y de Rab 11 en las vesículas conteniendo vinculina es dependiente del tiempo de estimulación con BK.

Debido al diseño experimental, los resultados representan la totalidad de estas proteínas presentes en las muestras de vesículas aisladas de cortes de papila, sin discriminar entre vesículas de la región perinuclear y marginal.

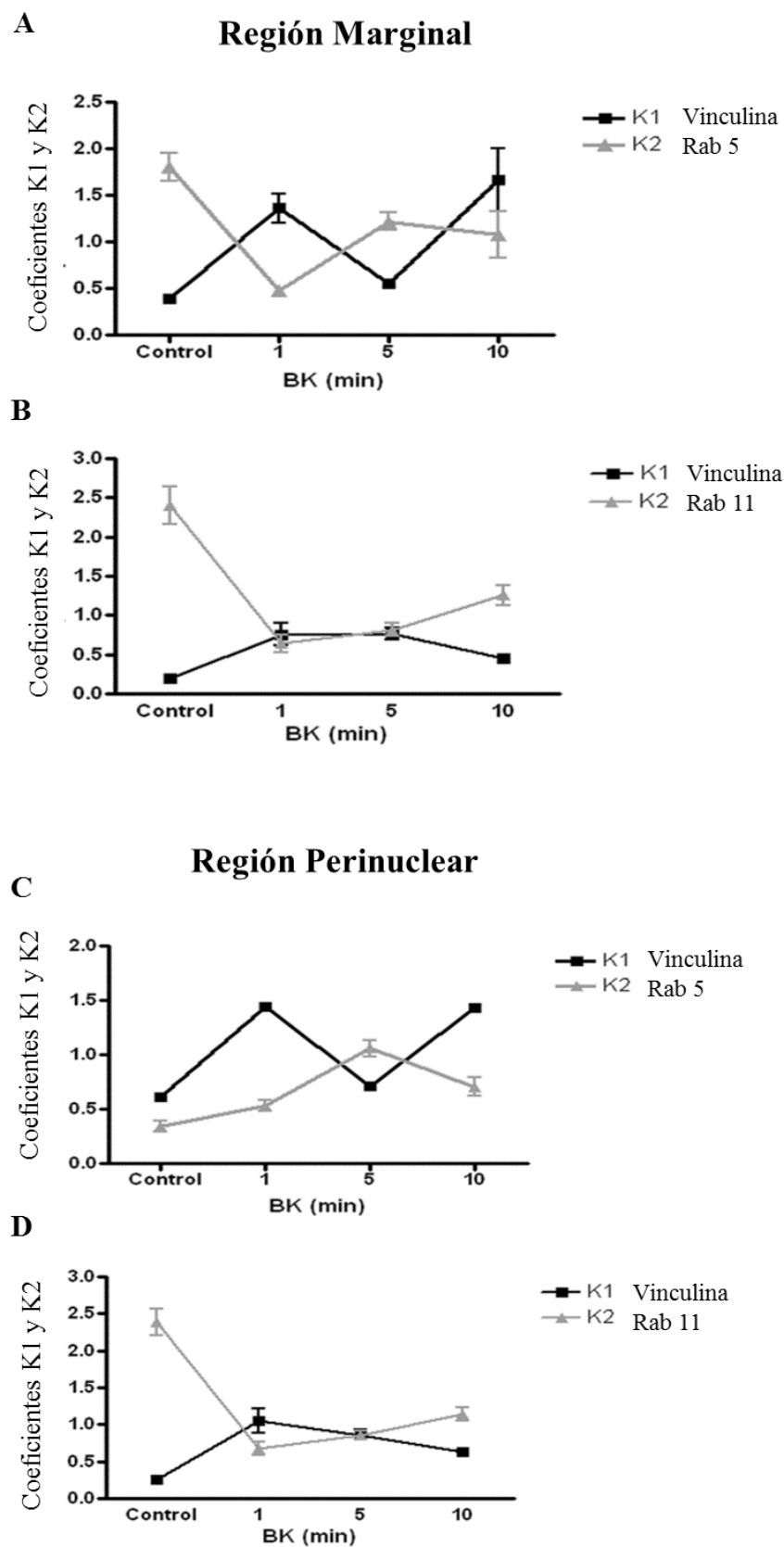


Figura 31-Análisis cuantitativo de los coeficientes de colocación K1 (vinculina) y K2 (Rab 5 o Rab 11) en las regiones perinuclear y marginal de las células de túbulo colector de la papila renal. Se muestra un promedio de los coeficientes de colocación K1 (vinculina) y K2 (Rab 5 o Rab 11) en la región marginal (A y B) y en la región perinuclear (C y D) en las células para cada tiempo de estimulación con BK. Los valores representan la media \pm error estándar (n=3).

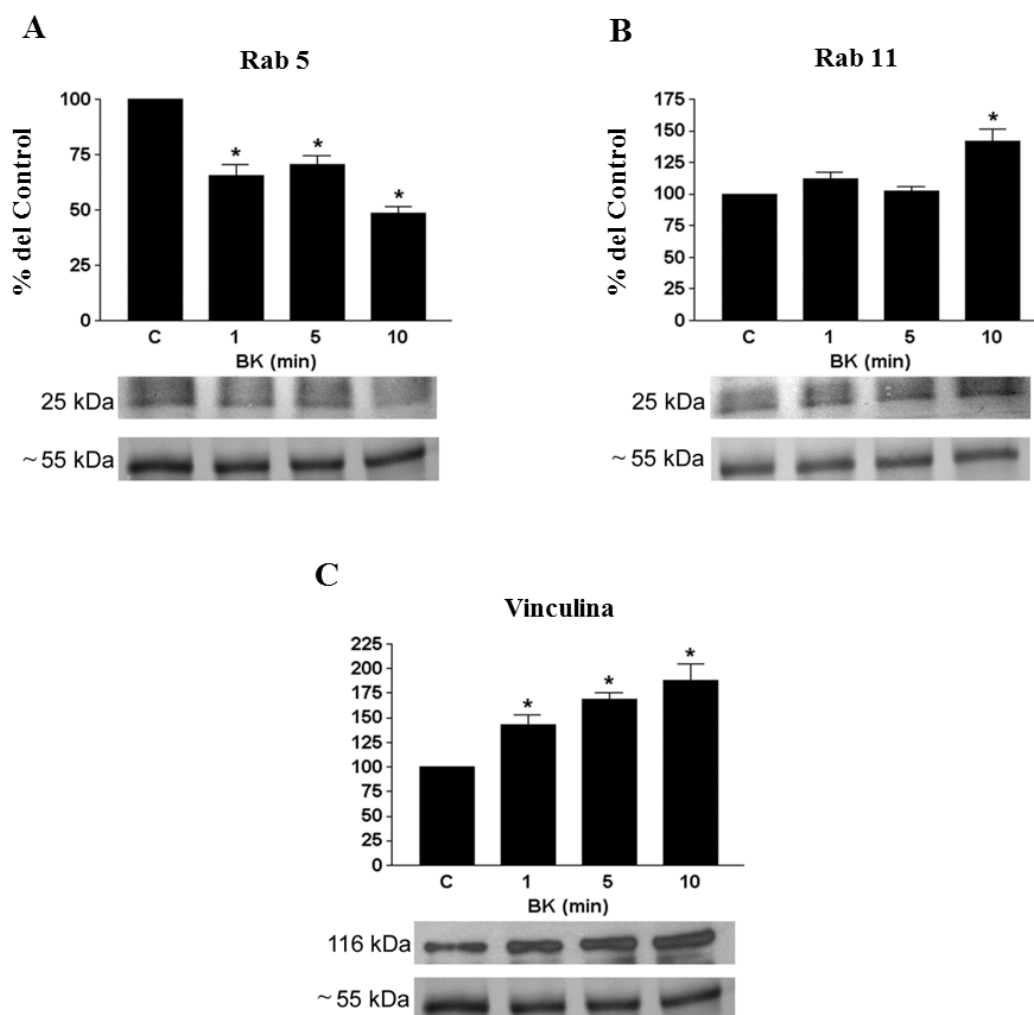


Figura 32-Análisis de la expresión de Rab 5 y Rab 11 en las vesículas que contienen vinculina en función del tiempo de estimulación con BK. Las vesículas conteniendo vinculina fueron inmunoadsorbidas a partir de cortes de papila renal, tratadas y no tratadas con BK durante 1, 5 y 10 min. Se analizaron iguales cantidades de proteínas totales de cada condición experimental por Western Blot utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas indicadas. (C) Las bandas de vinculina se revelaron mediante quimioluminiscencia, y la misma membrana fue eluída y vuelta a incubarse con un anticuerpo dirigido contra Rab 5 u Rab 11. Las bandas de Rab 11 como Rab 5 (A y B) se evidenciaron mediante el uso del sistema avidina-biotina-peroxidasa y 3,3'-diaminobenzidina. El control de carga de las proteínas se realizó mediante tinción con Coomassie blue. Los resultados están expresados como porcentaje del control (100%) y corresponden a la media \pm error estándar de tres experimentos. *Diferencias significativas con respecto al control, $p < 0.05$.

Resumiendo, estos resultados sugieren que en las células sin tratar, las vesículas Rab 5/Rab 11 positivas se encuentran presentes en el citosol, pero contienen poca cantidad de vinculina. Después de la estimulación con BK, la vinculina parece ser reclutada por las vesículas Rab 5/Rab 11 positivas preexistentes en el citosol. El análisis cuantitativo por Western Blot mostró diferencias en las cantidades de Rab 5 y Rab 11 en las vesículas dependiendo del tiempo de estimulación con BK. Las variaciones en el grado de contribución en la colocación de vinculina y Rab 5/Rab 11 reflejan los cambios en la cantidad de proteínas Rabs y de vinculina en las vesículas para asegurar el transporte intracelular de vinculina cuando no se encuentra formando parte de los CF, es decir cuando conforma el pool citosólico.

5. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS EN EL TRANSPORTE DE LAS VESÍCULAS

En los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio que dieron lugar al desarrollo de este trabajo de tesis, se demostró que la hormona intrarrenal BK ejerce una acción moduladora sobre los CF, movilizandovinculina pero no talina, de manera reversible, con la consiguiente formación de vesículas que contienen vinculina y componentes del compartimento de reciclaje endosomal [146]. Estas vesículas, mediante una vía polarizada de exocitosis, transportan vinculina a los sitios de rearmado de los CF, hecho que normalmente ocurre a tiempos largos de estimulación con BK. Además, se demostró que la BK induce una reorganización del citoesqueleto de actina, y que el tratamiento de las células de túbulo colector con un agente despolimerizante del citoesqueleto de actina (citocalisina D), impide el rearmado de los CF. Estos hallazgos demostraron que el transporte de las vesículas conteniendo vinculina hacia los sitios de la membrana plasmática, donde ocurre el rearmado de los CF, depende del citoesqueleto de actina [146].

Con el objeto de estudiar si los microtúbulos participan en el transporte de las vesículas que contienen vinculina hacia los sitios de rearmado de los CF, se incubaron las células de túbulo colector del cultivo primario con un agente despolimerizante de los microtúbulos, *colchicina* (10 mM), durante 15 min previos a la estimulación con BK. Luego se analizó la presencia de vesículas conteniendo vinculina, y la morfología celular. En la Figura 33, se muestran las células de túbulo colector en cultivo primario incubadas en presencia de colchicina según el protocolo detallado en el capítulo de materiales y métodos.

Se observó que el tratamiento de las células solo con colchicina, que constituye el control del experimento, no impidió la formación de las vesículas que contienen vinculina (Figura 33A, inserto), y las células mantienen una morfología extendida debido a que permanecen adheridas a la matriz extracelular mediante los CF inmunomarcados con vinculina (Figura 33A, puntas de flecha). En las células pre-tratadas con colchicina y estimuladas con BK durante 1 min, se

observa gran cantidad de vesículas conteniendo vinculina dispersas en el citosol, y las células aún mantienen una morfología extendida (Figura 33B, flechas). A tiempos más largos de estimulación, se observa una pérdida de la morfología extendida, con un predominio de la forma redondeada (Figura 33C-D, asteriscos). Esto podría deberse a la falta de rearmado de los CF, hecho que ocurre a tiempos largos de estimulación con BK, en ausencia de colchicina (Figura 16). Estos resultados sugieren que los microtúbulos participan en el transporte de las vesículas que contienen vinculina hacia los sitios de rearmado de los CF, pero no en la formación de las mismas.

En conjunto, estos resultados indican que, además de los filamentos de actina, los microtúbulos también participan en el transporte de las vesículas que contienen vinculina hacia los sitios de la membrana plasmática donde ocurre el rearmado de los CF.

A modo de resumen, y sobre la base de los resultados presentados hasta el momento, se puede interpretar que la vinculina presente en el pool citosólico, se mueve entre una forma citosólica libre y una asociada a vesículas, para luego ser incluida en los CF. Estas vesículas, además de PIP₂, contienen Rab 5, Rab 11, y el receptor de transferrina, marcadores clásicos del compartimiento endosomal de reciclaje. Esto podría constituir un mecanismo fisiológico por el cual la célula puede reutilizar la vinculina internalizada durante la reestructuración de los CF inducida por BK en las células de túbulo colector de papila renal.

6. ANALISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE BK EN LA INDUCCIÓN DE VESÍCULAS CONTENIENDO VINCULINA

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en las células de túbulo colector de papila renal, las proteínas que forman parte de los CF se localizan en microdominios *raft*, y el tratamiento de estas células con agentes que alteran la composición lipídica de la membrana provoca la disipación de vinculina y talina de los CF en forma irreversible [113, 114]. Con el objeto de investigar si la formación de las vesículas que contienen vinculina, con las características hasta ahora descritas, es un fenómeno específico inducido por bradiquinina o se trata de un fenómeno general, se estudió la presencia de estas vesículas en cultivos primarios de células del túbulo colector tratados con metil- β -ciclodextrina (CDex) -un conocido agente que extrae colesterol de las membranas- [179], y con neomicina -agente que secuestra PIP₂ de las membranas- [180]. En la Figura 34 se muestran imágenes de microscopia confocal de células de túbulo colector tratadas con los agentes e inmunomarcadas con un anticuerpo dirigido contra vinculina. En las células sin tratar (control), se observa como la vinculina forma parte tanto de los CF, que se hallan presentes en gran cantidad (Figura 34, flechas), como del pool citosólico. En las células tratadas con los agentes, se observa una disipación de los CF y formación de estructuras vesiculares que contienen vinculina (Figura 34, puntas de flechas en las ampliaciones de las regiones indicadas con recuadros).

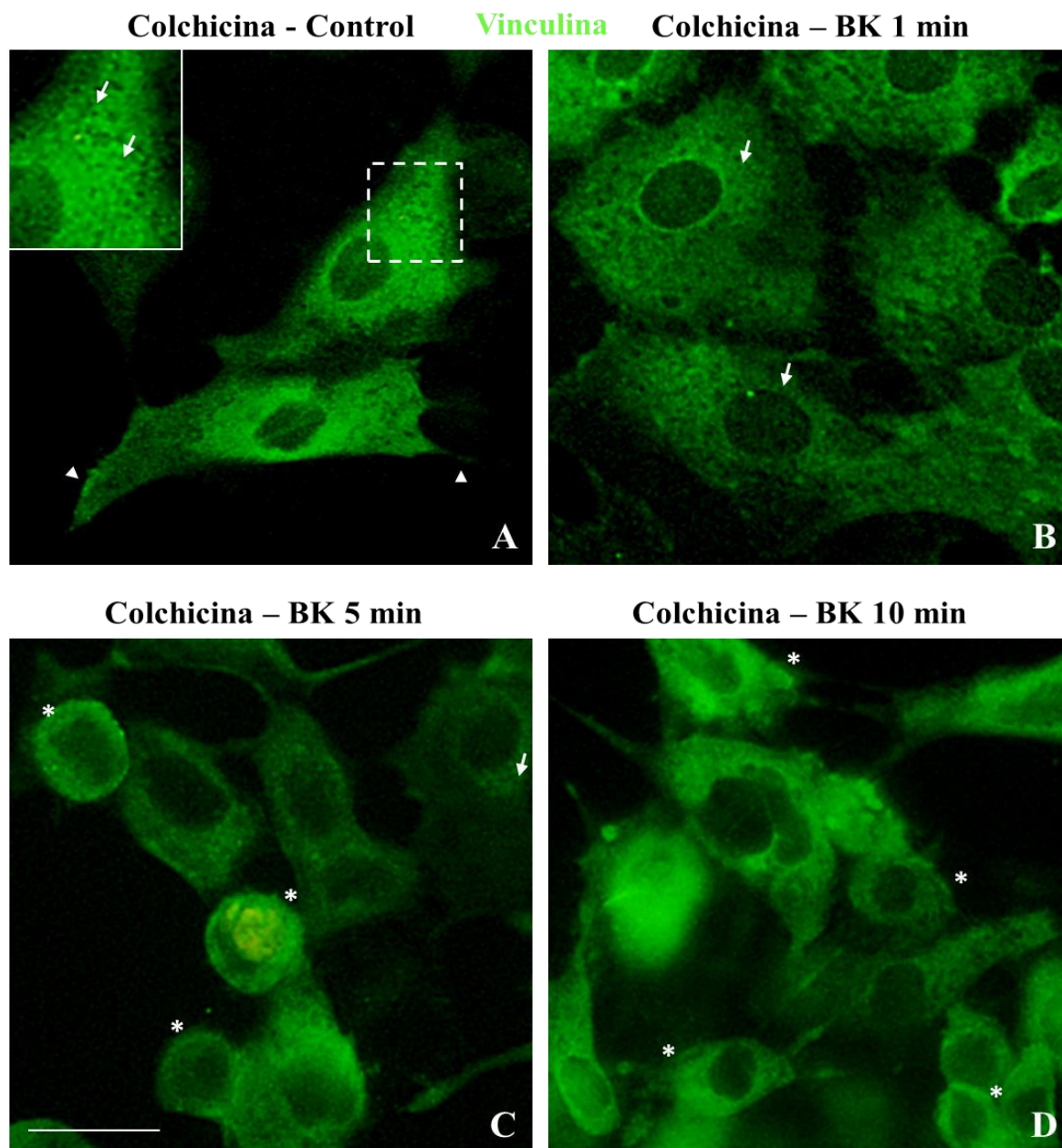


Figura 33- Participación de los microtúbulos en el transporte de las vesículas. Cultivos primarios de células de túbulo colector tratados con el agente despolimerizante colchicina. (A) Control incubado solo con colchicina, las flechas señalan a las vesículas que contienen vinculina, las cuales puede observarse mejor en la ampliificación de la imagen. Las puntas de flechas señalan a los CF que les permiten a las células mantener su morfología extendida. En B, C y D los asteriscos indican células que han adquirido morfología redondeada. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barra: 100 μ m.

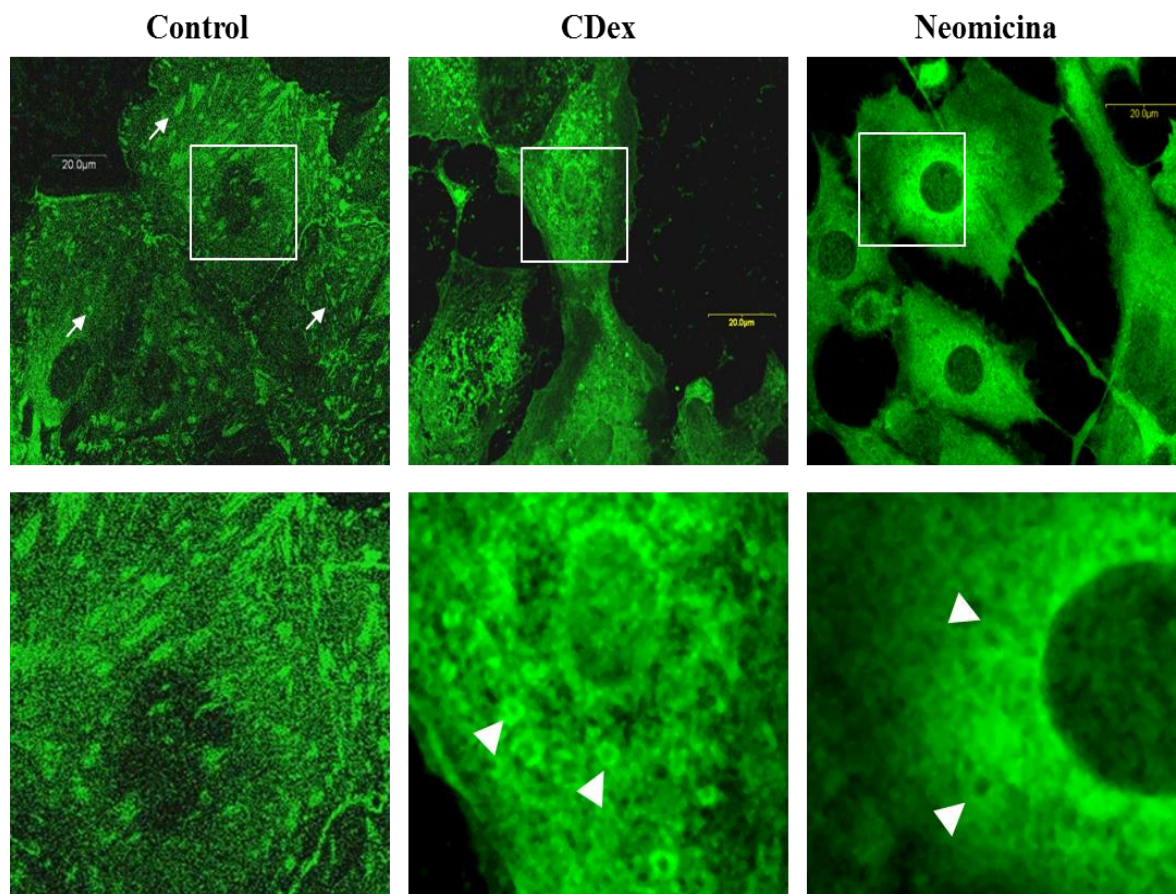


Figura 34- Análisis de la especificidad de BK en la inducción de vesículas conteniendo vinculina
 Imágenes de microscopia confocal de células de túbulo colector en cultivos primarios tratadas con metil- β -ciclodextrina (CDex) y neomicina, e inmunomarcadas con un anticuerpo dirigido contra vinculina. En el panel inferior se muestran las ampliaciones de las regiones indicadas con recuadros. Las flechas señalan CF en las células control, y las puntas de flechas indican estructuras vesiculares inmunomarcadas con vinculina en las células tratadas con CDex y neomicina. Se presentan las imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barra: 20 μ m

Para investigar si las vesículas formadas en presencia de estos agentes presentan características bioquímicas similares a las descritas previamente, se realizó un aislamiento de las mismas por el método inmunomagnético a partir del sobrenadante postnuclear de cortes de papila renal tratados con neomicina y con CDex según el protocolo descrito en el capítulo de materiales y métodos. En la Figura 35 se muestran los resultados de los Western Blot en los cuales se analizó la presencia de Rab 5, Rab 11 y del receptor de transferrina (RTf). Como control positivo de la presencia de estas proteínas, se sembraron muestras de fracción microsomal. En ninguno de los tratamientos se detectó señal positiva para los marcadores del compartimento de reciclaje endosomal investigados. Para corroborar este resultado, se duplicó la cantidad de proteínas sembradas, obteniéndose similar resultado.

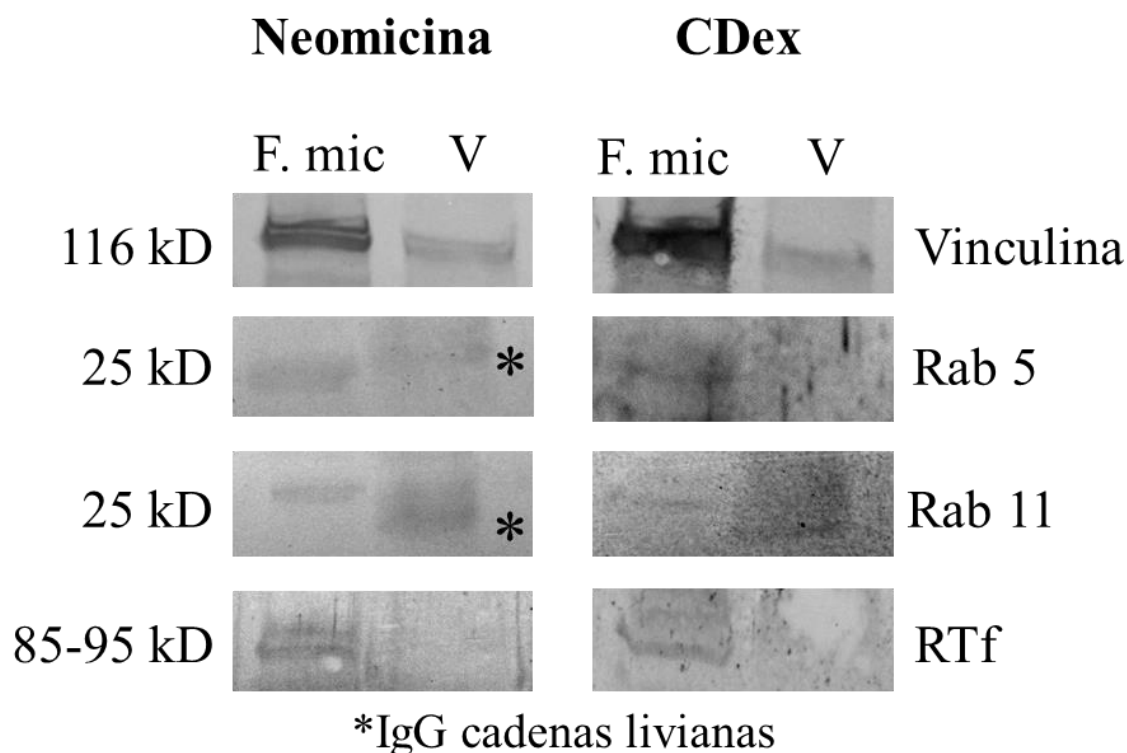


Figura 35- Análisis de la presencia de marcadores del compartimiento de reciclaje endosomal en las vesículas que contienen vinculina. Las vesículas (V) se aislaron por el método inmunomagnético utilizando como material de partida el sobrenadante postnuclear de cortes de papila renal tratados con neomicina y metil- β -ciclodextrina (CDex) como se describió en la sección de materiales y métodos. La presencia de vinculina, Rab 5, Rab 11 y del receptor de transferrina (RTf) se analizó por Western Blot. Como control positivo de la presencia de estas proteínas se sembró una muestra de la fracción microsomal (F. mic). Los asteriscos señalan la cadena liviana de las IgG (23-26 kDa). Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes.

Estos resultados indican que en las células de túbulo colector de papila renal, la formación de vesículas conteniendo vinculina, inducida por BK, podría constituir un mecanismo fisiológico por el cual la célula reutiliza las moléculas de vinculina internalizadas durante el proceso de reestructuración de los CF. Sobre la base de estos resultados, se demuestra que contrariamente al efecto reversible de BK, los agentes CDex y neomicina inducen la disipación de vinculina de los CF de forma irreversible como consecuencia del cambio global en la composición lipídica de la membrana, descrita en trabajos previos [113, 114], puesto que los CF no vuelven a formarse. Probablemente estos agentes, por su efecto deletéreo, induzcan una vesiculización de la membrana plasmática, y no un mecanismo fisiológico como lo es la formación de endosomas inducido por BK.

PARTICIPACIÓN DE LA VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN DE LAS CELULAS DE TÚBULO COLECTOR DE LA PAPILA RENAL

La organización tubular de la papila renal depende de la unión de las células con la matriz extracelular y de las uniones célula-célula, las cuales están mediadas principalmente por los contactos focales (CF) y las uniones adherentes (UA), respectivamente [43, 52]. Debido a la función que ejercen, las proteínas que componen ambas estructuras se asocian con la membrana plasmática. Utilizando como modelo experimental, cultivos primarios de células de túbulo colector de papila renal de ratas adultas, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado con anterioridad que tanto las UA como los CF se localizan en dominios específicos de membrana enriquecidos en colesterol y esfingomielina (SM), y que la modificación de la composición lipídica de los mismos induce una alteración en estas estructuras de adhesión [113, 114, 115]. Puesto que la vinculina forma parte de ambas estructuras de adhesión, el segundo objetivo general del presente trabajo de tesis es el de investigar el rol que cumple la molécula de vinculina en el mantenimiento de las estructuras de adhesión celular cuando se altera la síntesis de SM, mediante la inhibición de una enzima que participa en su síntesis, la SM sintasa.

1. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN ESFINGOMIELINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA

1.1 Efecto de la inhibición farmacológica de las esfingomielina sintasas (SMSs) sobre las uniones adherentes

Como se mencionó en la introducción, una característica relevante del epitelio diferenciado es la presencia de UA maduras. Con el objeto de estudiar el efecto que provoca sobre las UA la inhibición farmacológica de las enzimas que sintetizan SM, se utilizaron cultivos primarios de células del túbulo colector como modelo experimental para llevar a cabo los ensayos. A las 72 h del cultivo, cuando se observó que las células se encontraban estrechamente unidas, se agregó al medio de cultivo un inhibidor de la esfingomielina sintasa 1 (SMS1) y de la esfingomielina sintasa 2 (SMS2), llamado D609 [133], y se incubó durante 24 h adicionales con concentraciones crecientes del inhibidor (20, 50 y 100 μ M). La enzima SMS1 cataliza la síntesis de SM a partir de ceramida y fosfatidilcolina en el aparato de Golgi, mientras que la

SMS2 lo hace en la membrana plasmática. Finalmente, se analizó el efecto del inhibidor sobre las UA mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas que conforman estos complejos proteicos: E-cadherina, β - y α -catenina y vinculina. Debido a que la α -catenina une el complejo E-cadherina/ β -catenina directamente con el citoesqueleto de actina, y que vinculina puede formar parte de las UA por interacción con α -catenina, en una primera etapa estudiamos la distribución de estas dos proteínas mediante microscopía confocal, analizando el plano focal medio, que es donde se localizan las uniones intercelulares.

En general, dentro de cada lámina celular que se forma en los cultivos primarios de células del TC existen dos regiones o poblaciones celulares: las células más internas de las colonias y las células periféricas. En los cultivos sin tratar, α -catenina y vinculina se observan delimitando los bordes de las células internas, y ambas proteínas colocalizan en las zonas de contactos célula-célula, reflejando la presencia de UA como se muestra en las imágenes de segmentación en donde la colocalización aparece de color blanco (Figura 36A-A'). Esto se observa mejor en la ampliación de la región indicada en la Figura 36A'.

Cuando las células fueron incubadas con concentraciones crecientes del inhibidor D609, se observa una alteración de la típica morfología extendida que adquieren estas células epiteliales en el cultivo primario (Figuras 36B-C-D). En contraposición al alto grado de colocalización de vinculina y α -catenina observado en las uniones célula-célula de los cultivos sin tratar, el inhibidor provoca la pérdida de colocalización. Este efecto fue más evidente a mayores concentraciones del inhibidor, como se muestra en las ampliaciones y en las imágenes de segmentación (Figuras 36B'-C'-D'). Consecuentemente, las uniones intercelulares aparecen desintegradas (Figura 36C', puntas de flechas), y concomitantemente, tanto la α -catenina como la vinculina aparecen internalizadas en forma masiva en estructuras vesiculares (Figura 36B'-C'-asteriscos). En la concentración de 100 μ M, las uniones célula-célula se observan muy alteradas, y las células presentan bordes de apariencia irregular y con adquisición de una forma alargada de tipo fibroblastoide (Figura 36D, flechas). Pero a pesar del gran deterioro que se observa en la morfología, las células se mantienen unidas a la matriz extracelular mediante CF inmunomarcados con vinculina (Figura 36D', flechas).

Teniendo en cuenta que además de interactuar con el citoesqueleto de actina, en las UA la α -catenina se une a β -catenina, y mediante esta proteína a E-cadherina, a continuación se estudió el efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs en la distribución de α -catenina/ β -catenina y β -catenina/E-cadherina. Para este ensayo se utilizó una concentración del inhibidor de 50 μ M, puesto que induce sobre las células cambios morfológicos moderados sin pérdida del fenotipo epitelial, como se observa en la Figura 36C. En las células sin tratar, se observa que α - y β -catenina presentan un patrón de distribución similar, con un alto grado de colocalización en los bordes celulares, como se muestra en la imagen de color y de segmentación (Figura 37A, inserto y colocalización). Después de la incubación con el inhibidor D609, se observa una alteración en las uniones célula-célula, acompañada de la separación entre las células (Figura 37B, flechas en la ampliación de la zona indicada con un recuadro). Además, en la imagen

de segmentación se observa un menor grado de colocalización entre las proteínas (Figura 37B, colocalización).

Puesto que β -catenina se asocia con el dominio citosólico de E-cadherina, se evaluó la distribución de ambas proteínas en las mismas condiciones que en el caso anterior. Como era de esperar, en las células sin tratar E-cadherina y β -catenina colocalizan en los bordes celulares como se muestra en la imagen de color y de segmentación (Figura 37C-C'), reflejando la presencia de UA maduras entre las células. Luego de incubar las células con D609, se observa una disminución en el grado de colocalización entre ambas proteínas. Es importante destacar la presencia de estructuras similares a “puentes” inmunomarcados con β -catenina entre las células en proceso de separación (Figura 37D, flechas en la ampliación de la zona indicada con un recuadro).

1.2 Efecto del silenciamiento génico de la SMS1 y SMS2 sobre las uniones adherentes

En una segunda etapa del estudio, para confirmar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad de las SMSs sobre las UA, y analizar en grado de participación de cada enzima en el mantenimiento de estas estructuras, se realizaron experimentos de silenciamiento génico utilizando ARN de interferencia pequeños (siRNA) específicos para la SMS1 y 2. Para ello, a las 48 hs de crecimiento, cuando las células habían adquirido un alto grado de unión entre ellas, se realizaron las transfecciones con los siRNA específicos para la SMS1 o SMS2, conjuntamente con un siRNA conjugado con AlexaFluor 488 (siRNA control o scrambled) que no reconoce ningún ARNm en las células. Las células tratadas solo con el siRNA scrambled fueron utilizadas para evaluar si el proceso de transfección provocaba alguna alteración en las estructuras de adhesión. De esta forma, las células que exhibieron puntos fluorescentes de color verde en el citosol fueron consideradas positivas para la transfección. El análisis de las células se realizó mediante microscopía de contraste de fases e inmunomarcación con un anticuerpo dirigido contra α -catenina.

En la Figura 38A, se muestran las células transfectadas con el siRNA scrambled. En las células inmunomarcadas se observa que α -catenina delimita los bordes celulares, reflejando la integridad de las uniones intercelulares, hecho que también se observa en las imágenes de contraste de fase (Figura 38D). Por los tanto, el proceso de transfección no alteró el comportamiento de las células en el cultivo primario. Por el contrario, las células que incorporaron el siRNA específico para la SMS1 presentaron una distribución de α -catenina discontinua en los bordes celulares, lo que refleja una alteración en las uniones célula-célula (Figura 38B, flechas). Estas alteraciones sobre las uniones célula-célula también pueden observarse en las imágenes de contraste de fase (Figura 38E). En las células transfectadas con el siRNA específico para la SMS2, no se observaron cambios en la distribución de α -catenina en los bordes celulares, hecho que también es coincidente en las imágenes de microscopía de contraste de fase (Figura 38C y F).

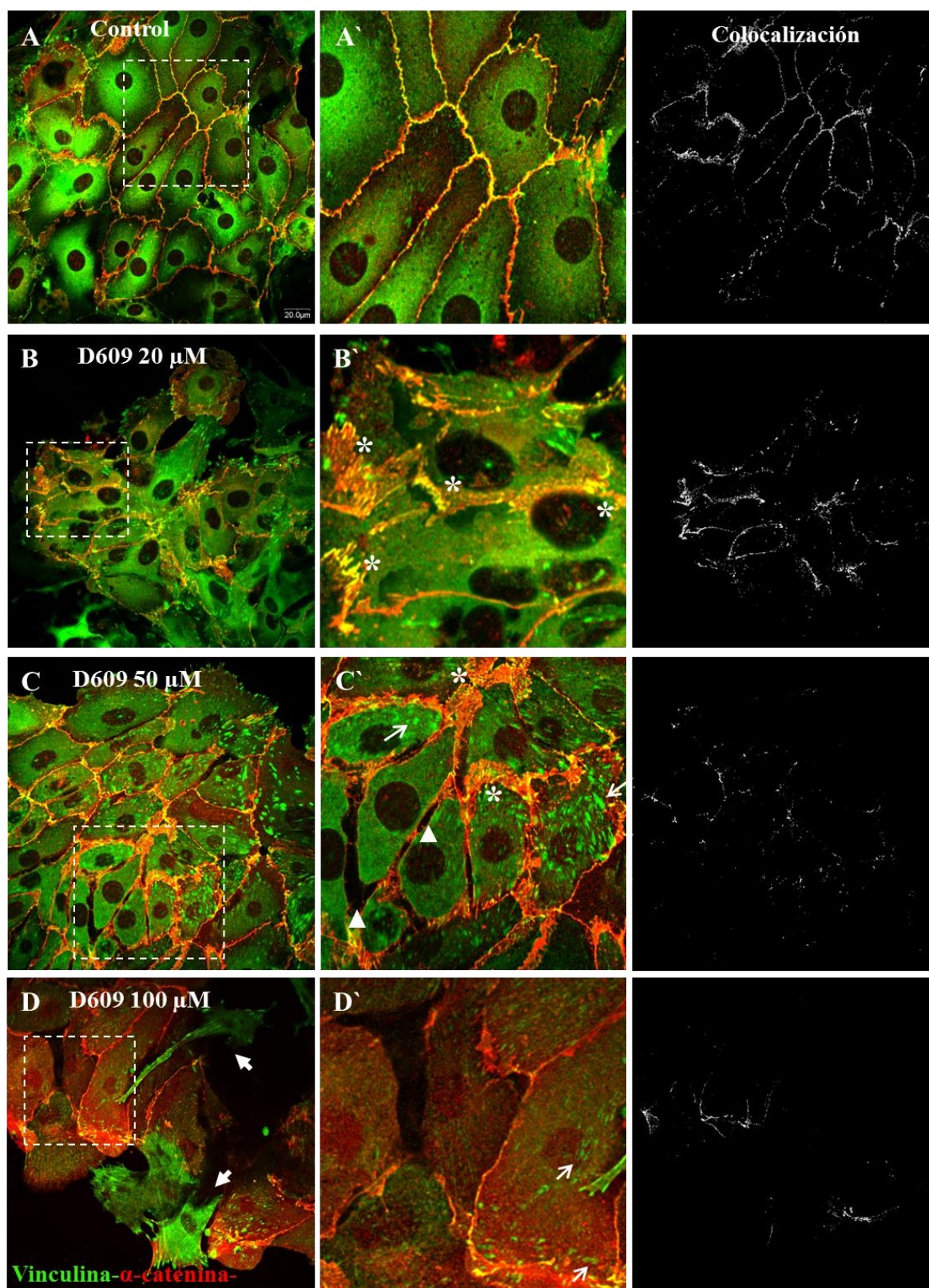


Figura 36-Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre las estructuras de adhesión célula-célula. Descripción en página 78.

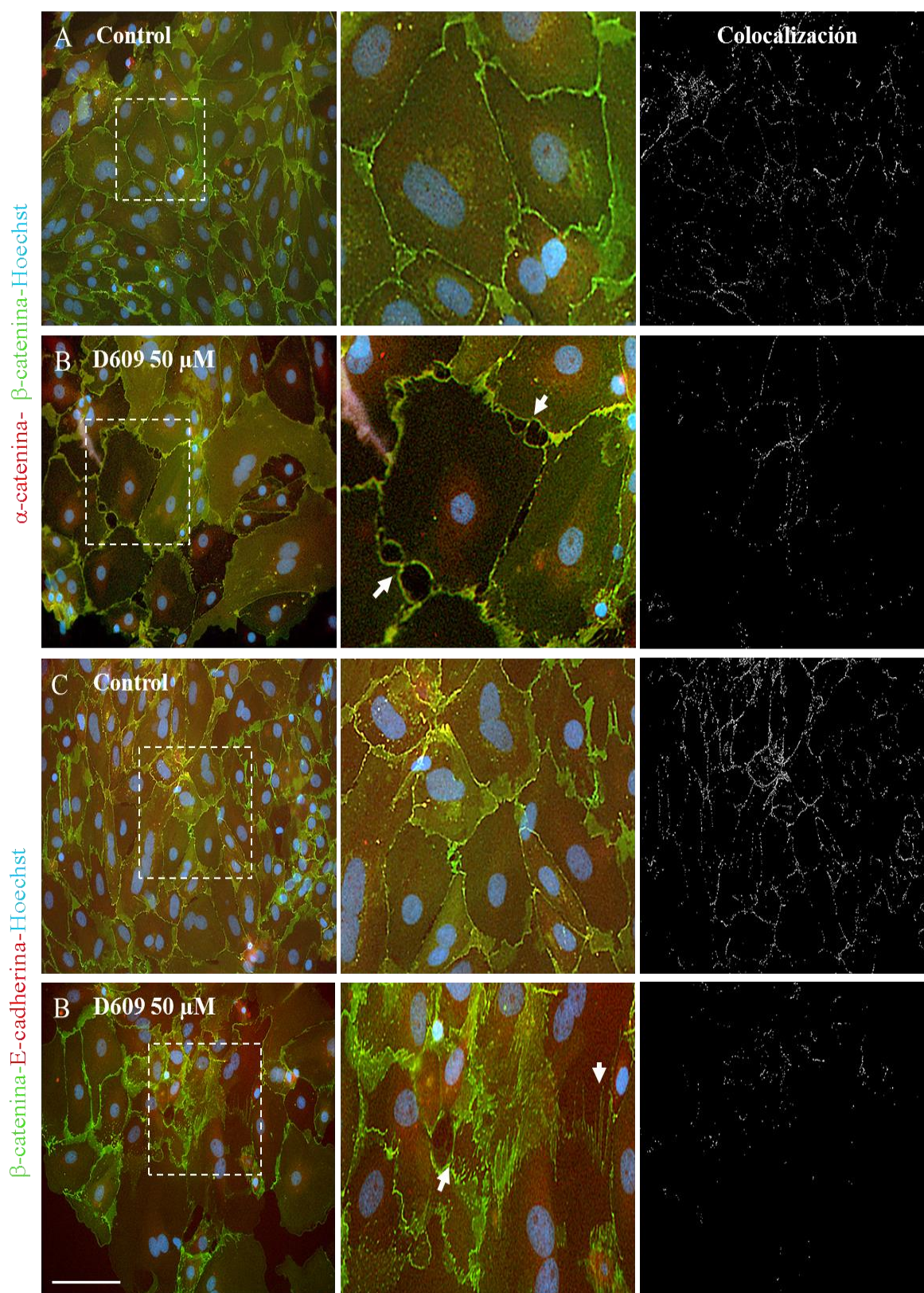


Figura 37-Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre las estructuras de adhesión célula-célula. Descripción en página 78.

Figura 36-Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre las estructuras de adhesión célula-célula 1. Las células fueron incubadas en presencia de un inhibidor de la SMS1 y 2, D609; en las concentraciones indicadas, y posteriormente inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos contra vinculina (verde) y contra α -catenina (rojo). En la segunda columna de imágenes (central) se muestran las ampliaciones de las zonas indicadas en recuadros. La tercera columna corresponde a las imágenes de segmentación de las figuras no ampliadas, que indican la colocalización de las proteínas en color blanco sobre un fondo negro. Se muestran imágenes de microscopia confocal tomadas con un objetivo de 60X. Barra: 20 μ m.

Figura 37-Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre las estructuras de adhesión célula-célula 2. Las células fueron incubadas en presencia de D609 en la concentración de 50 μ M, y posteriormente inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos en (A) y (B) contra α -catenina (rojo) y β -catenina (verde), y en (C) y (D) contra β -catenina (verde) y E-cadherina (rojo). Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33258 (azul). Se muestran imágenes de microscopia de fluorescencia convencional con objetivo de 40X. En la segunda columna de imágenes (central) se muestran las ampliaciones de las zonas indicadas en recuadros, y la tercera columna corresponde a las imágenes de segmentación de las figuras no ampliadas, que indican la colocalización de las proteínas en color blanco sobre un fondo negro. Barra: 100 μ m.

Sobre la base de los resultados expuestos, se puede interpretar que la actividad de la SMS1, y no de la SMS2, es la necesaria para el mantenimiento de las uniones adherentes entre las células del TC de la papila renal.

1.3- Efecto de la inhibición de la actividad de las SMSs sobre las proteínas que forman parte de las uniones adherentes

Las células requieren del funcionamiento y expresión constante de las proteínas que forman parte de las UA para mantener la asociación y organización de un epitelio [13]. Se sabe que las UA mantienen un activo recambio de las proteínas del complejo adherente a través de la internalización del complejo de adhesión por la vía endocítica, con su posterior reciclaje vía vesicular. También se sabe que E-cadherina presenta una vida media de 5-10 h en el complejo adherente. Por ello, la síntesis y el eficiente tráfico vesicular de E-cadherina resulta fundamental para el mantenimiento de las estructuras de adhesión célula-célula, y por ende del estado diferenciado [137, 138].

Es por este motivo que se estudió si el deterioro en las uniones intercelulares inducido por la inhibición de las SMSs se debe a una alteración en los niveles de las proteínas que forman parte de las UA. Para ello se analizó mediante Western Blot la cantidad de vinculina, E-cadherina, y α - y β -catenina en las células incubadas con una concentración de 50 μ M de D609. Como se muestra en la Figura 39, la cantidad de vinculina y α -catenina aumentó significativamente en

las células tratadas con el inhibidor mientras que no se produjeron cambios significativos en los niveles de E-cadherina y β -catenina. Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas sobre las UA inducidas por el inhibidor D609 no se pueden atribuir a la disminución de los niveles de las proteínas que forman estas estructuras.

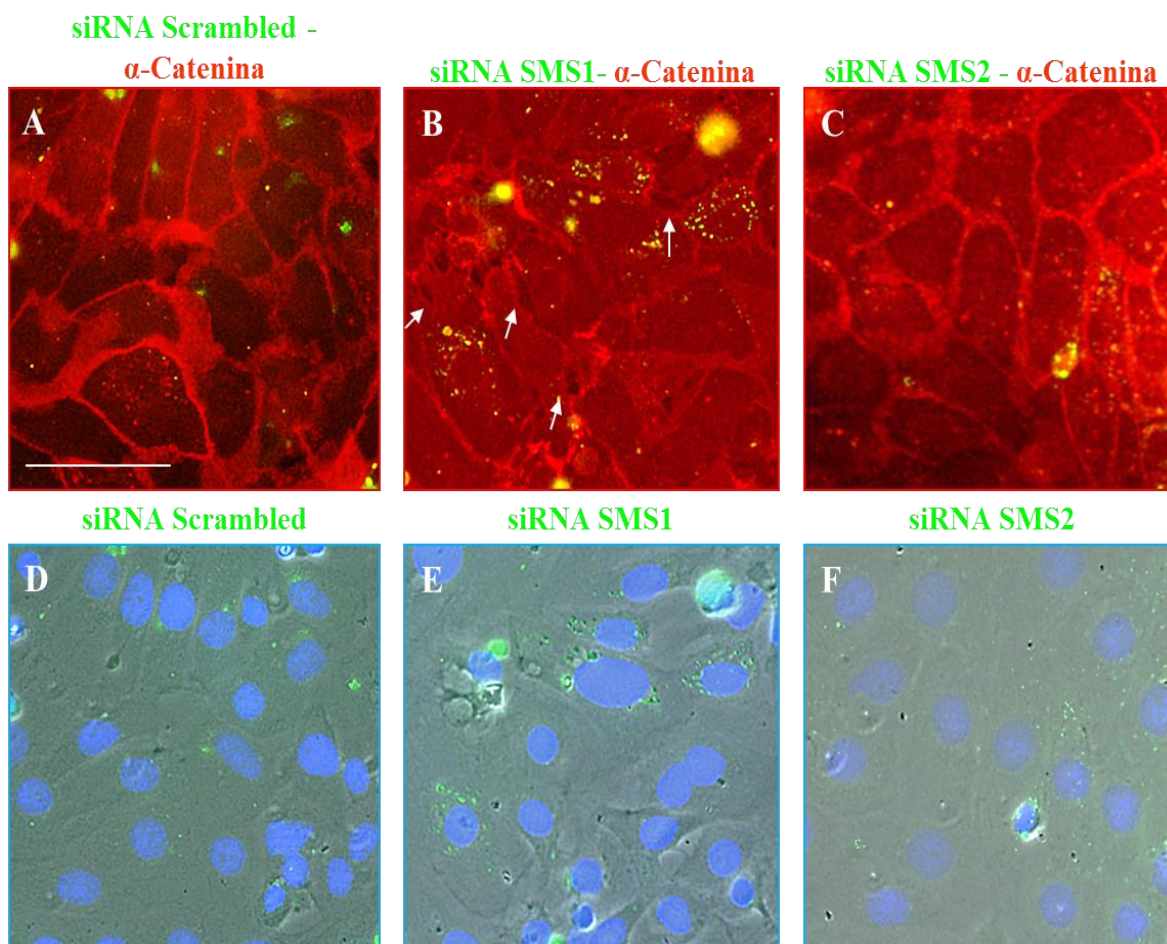


Figura 38- Efecto del silenciamiento génico de la SMS1 y 2 sobre las estructuras de adhesión célula-célula. Las células del cultivo primario fueron transfectadas con los siRNA específicos para SMS1 o SMS2, conjuntamente con un siRNA conjugado con AlexaFluor 488 (siRNA scrambled). La fluorescencia verde correspondiente al siRNA scrambled permitió localizar las células transfectadas. En **A**, **B** y **C** se muestran las células inmunomarcadas con un anticuerpo dirigido contra α -catenina (rojo), y en **D**, **E**, **F** las imágenes correspondientes al mismo campo obtenidas mediante microscopia de contraste de fases. Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33258 (azul). Las flechas muestran alteraciones en las uniones intercelulares. Tanto las imágenes de fluorescencia como las de contraste de fases fueron captadas con objetivo de 40X. Barra: 100 μ m.

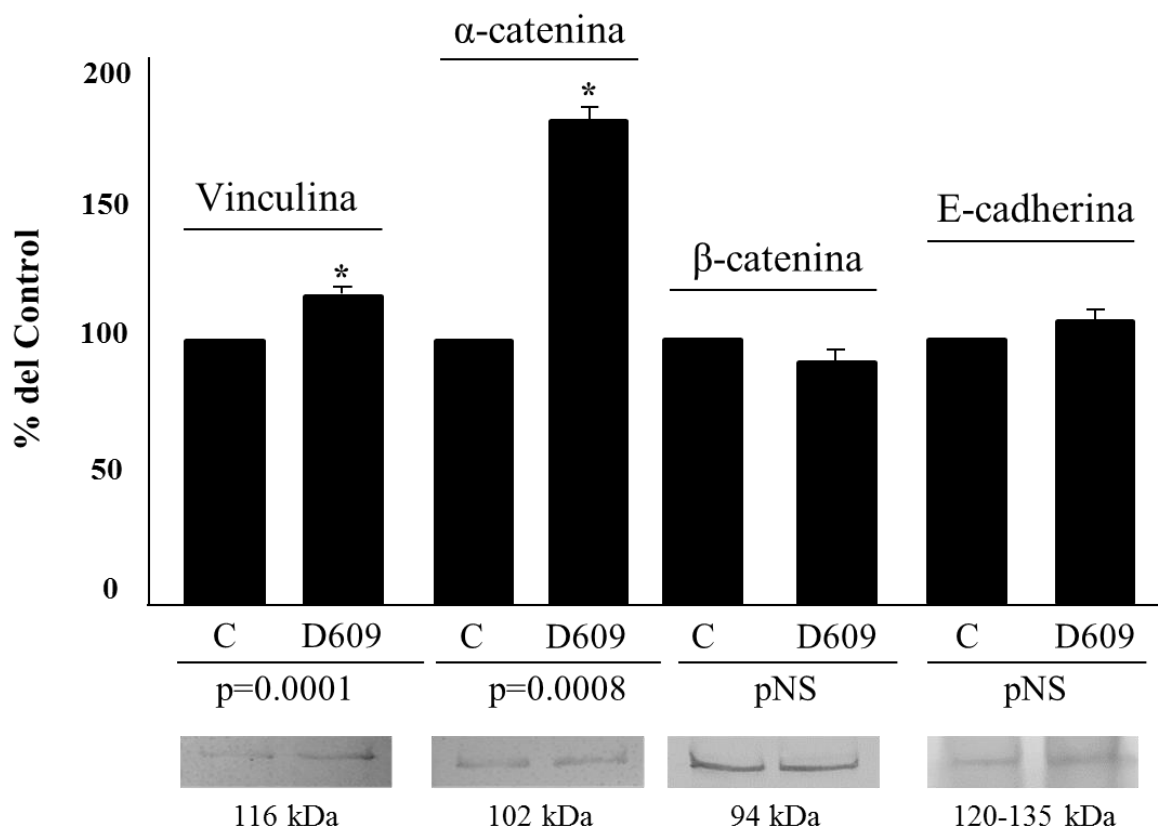


Figura 39- Efecto de la inhibición de la actividad de las SMSs sobre el contenido intracelular de las proteínas que forman parte de las uniones adherentes. Las células fueron incubadas con D609 en la concentración de 50 μ M. Para realizar el Western Blot, se sembraron iguales cantidades de proteínas totales (50 μ g) en cada condición experimental y se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas indicadas. Los resultados están expresados como porcentaje del control (100%) y corresponden a la media \pm error estándar de tres experimentos. *Diferencias significativas con respecto al control. pNS= diferencia no significativa en los valores de las medias con respecto al control.

2. ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN ESFINGOMIELINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULA-MATRIZ EXTRACELULAR

2.1 Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre los contactos focales

Se ha reportado que la alteración en la actividad de la SMS1 es capaz de reducir los niveles de SM en los dominios raft [133]. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han

demostrado que en las células del túbulo colector (TC) de papila renal, tanto las proteínas que forman parte de las uniones adherentes como de los contactos focales (CF) se localizan en microdominios rafts [113, 114, 115]. En el capítulo anterior se ha analizado el efecto que produce la inhibición de la actividad de las SMSs sobre las uniones intercelulares. En este capítulo se presentan los resultados sobre el efecto que produce la inhibición farmacológica de las enzimas sobre las estructuras que mantienen las células unidas a la matriz extracelular, es decir, los CF. Para ello, cuando las células de TC en cultivo primario habían alcanzado un nivel alto de asociación entre ellas, se incubaron 24 hs adicionales en presencia del inhibidor D609 a la concentración de 50 μM . Luego las células fueron inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos contra dos proteínas que forman parte de los CF, vinculina y talina. Posteriormente, el análisis del efecto de la inhibición farmacológica se realizó a través de un estudio cuantitativo y morfométrico de los CF utilizando un software de análisis de imágenes como se describió en la sección de materiales y métodos. El recuento se realizó en forma diferencial, registrando el número de CF presente en las células internas y en las células más periféricas de las colonias.

El análisis cuantitativo muestra un incremento significativo en el número de CF inmunomarcados con vinculina -pero no con talina-, tanto en las células del interior como en las células más periféricas de la colonia (Figura 40A-D y Figura 41). A pesar de que se observa cierto grado de separación entre las células (Figura 40B, flechas), debido al deterioro ya descripto de las uniones adherentes, las células conservan su morfología extendida. Este fenómeno muy probablemente se deba al incremento del número de CF inmunomarcados con vinculina, hecho que probablemente ocurre con el fin de mantener las células adheridas a la matriz extracelular.

El análisis morfométrico muestra un aumento en el tamaño de los CF que contienen vinculina en las células internas de la colonia, mientras que no se observan modificaciones en los CF que contienen talina en ninguna de las dos poblaciones celulares analizadas (Tabla 2).

Tabla 2: Estudio morfométrico de los contactos focales

| | Tamaño (μm^2) | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | Células Internas | | Células Periféricas | |
| | CF -Vinculina | CF-Talina | CF-Vinculina | CF-Talina |
| Control | 0.94 ± 0.11 | 1.76 ± 0.13 | 1.63 ± 0.10 | 1.72 ± 1.14 |
| D609 50 μM | $1.36 \pm 0.09^*$ | 1.67 ± 0.07 | 1.59 ± 0.05 | 1.84 ± 1.12 |

La tabla muestra el tamaño (en μm^2) de los CF que contienen vinculina y talina en las células de túbulo colector incubadas o no con el inhibidor D609, 50 μM . Los resultados se expresan como la media \pm error estándar (ES). *Diferencias significativas con respecto al control, $p=0,01$.

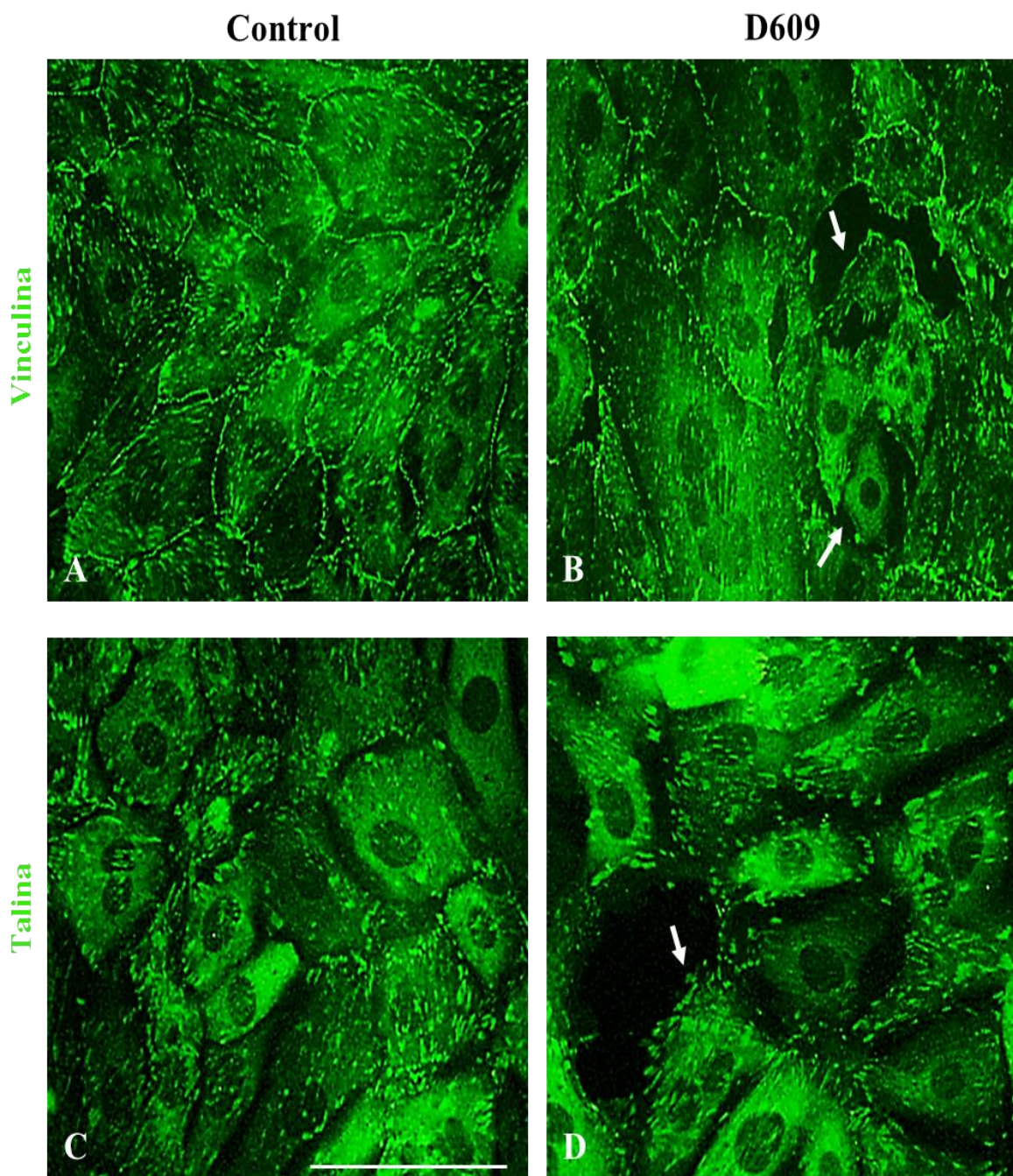


Figura 40- Efecto de la inhibición de las SMSs sobre los contactos focales (CF). Las células de túbulo colector control y tratadas con el inhibidor D609 (50 μ M) fueron inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos en (A) y (B) contra vinculina y en (C) y (D) contra talina. Las imágenes fueron captadas en la zona basal de las células, donde se localizan los CF, con un microscopio de fluorescencia convencional con objetivo de 40X. Las flechas indican las células en proceso de separación. Barra: 100 μ m.

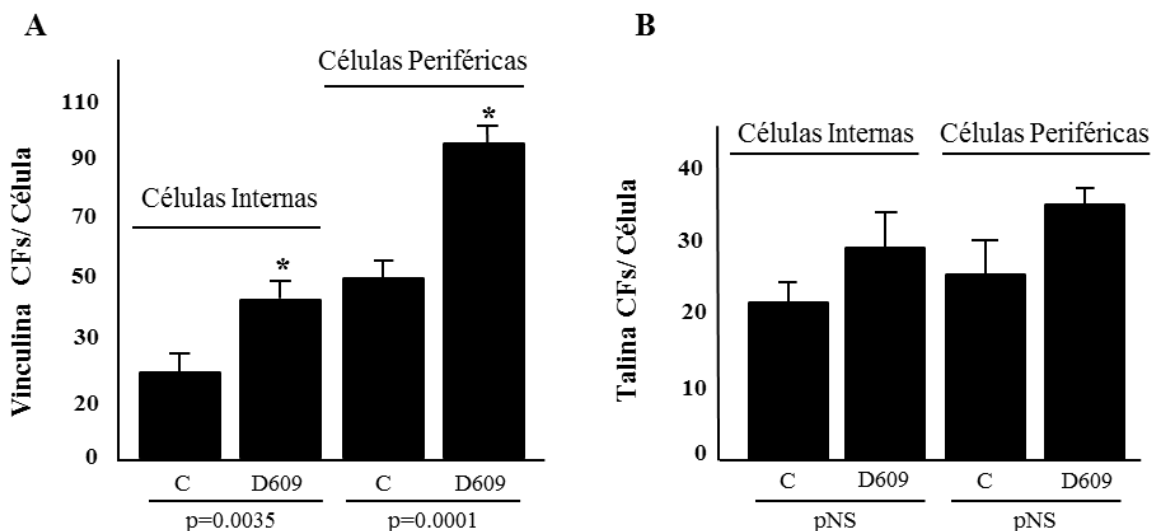


Figura 41- Análisis cuantitativo del número de CF/Célula. Mediante el software de análisis de imágenes Image-Pro Plus se realizó el recuento del número de CF por célula inmunomarcados en (A) contra vinculina y en (B) contra talina. El estudio se realizó teniendo en cuenta las dos poblaciones celulares. Los resultados corresponden a la media \pm error estándar de tres experimentos. *Diferencias significativas con respecto al control. pNS= diferencia no significativa en los valores de las medias entre las muestras.

2.2 Efecto de la inhibición farmacológica de las SMSs sobre el citoesqueleto de actina

Cuando la vinculina forma parte de las uniones adherentes (UA) se une a α -catenina provocando su activación y posterior unión a los filamentos de actina, los que forman una red cortical o *cinturón circunferencial* debajo de la membrana plasmática [28, 40]. Durante el proceso de organización del tejido epitelial, la formación de los contactos focales (CF) antecede y es requisito para el establecimiento de las UA. Los CF también se asocian al citoesqueleto de actina, el cual puede organizarse en forma de fibras de estrés (FS), y cumplen funciones importantes en la adhesión de las células a la matriz extracelular [52]. Por este motivo, se analizó el efecto que produce la inhibición de las SMSs sobre el citoesqueleto de actina. Para ello, se realizaron cultivos primarios de células de túbulo colector (TC), cuando habían adquirido un alto grado de asociación entre ellas, se incubaron con concentraciones crecientes del inhibidor de SMSs, D609. Mediante inmunocitoquímica de doble marcado se estudió el citoesqueleto de actina utilizando faloidina (se une a la F-actina), y a los CF y a las UA con un anticuerpo dirigido contra vinculina. En las células sin tratar, se observan los filamentos de actina formando una red cortical delimitando el borde de las células, que se asocia a las UA donde actina y vinculina colocalizan (Figura 42A, inserto). Como se mencionó en la introducción, existe una nomenclatura de las FS propuesta por Small, que dependiendo si se asocian o no con los CF por uno o ambos extremos, se las denomina *FS dorsales* (FSD) o

ventrales (FSV), respectivamente [99]. En la situación control, se observa un predominio de FSV en las células más internas, y de FSD en las células de la periferia de la colonia (Figura 42A, flechas). Esto mismo se observa con más detalle en las imágenes de microscopía confocal, que corresponde al plano más basal de la monocapa, que es donde se localizan los CF (Figura 43A-A'). Estas características reflejan la correcta organización del citoesqueleto de actina en las células de TC en el cultivo primario.

En presencia de concentraciones crecientes del inhibidor, se observa la pérdida gradual de la morfología epitelial típica, con alteración del cinturón circunferencial y separación entre las células. Para facilitar la observación en estas regiones se realizaron ampliaciones (Figura 42B-D, insertos). Este comportamiento de las células se observa con más detalle en las imágenes de microscopía confocal que se muestran en la Figura 43. A la concentración de 20 μM , puede apreciarse como las células pierden la unión entre ellas, y el deterioro de las UA es mayor a medida que aumenta la concentración del inhibidor de las SMSs, D609 (Figura 43B-B'-D-D', flechas). Estos resultados se correlacionan con la disipación de vinculina y α -catenina de los bordes celulares descritos en la sección 1.1 (Figura 36). Como consecuencia de la separación entre ellas, ocurre la contracción de algunas células (Figura 42C, flecha). A la mayor concentración del inhibidor ensayada (100 μM) es más notoria la pérdida de la morfología extendida típica de las células epiteliales (Figura 42D, flechas). La incubación de las células con el inhibidor D609 induce una remodelación de las FS, y se observa que a medida que el deterioro de las UA es mayor, predomina en las células las FSV (Figura 42B-D y 43B-D). Esto se correlacionaría con el aumento del número de CF inmunomarcados con vinculina en la concentración de 50 μM del inhibidor, que se describió en el punto 2.1, puesto que a diferencia de las FSD, las FSV se asocian con CF por ambos extremos (Figura 40B y Figura 41A). También se observa el mayor tamaño que adquieren los CF (Figura 43B'-D', puntas de flecha), en coincidencia con el estudio morfométrico que se describió en la Tabla 2

3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS SMSs

Con el fin de evaluar si los efectos producidos sobre las uniones célula-células por la inhibición farmacológica de las SMSs son reversibles, el cultivo de células de túbulo colector se incubó con el inhibidor D609 (50 μM) durante 24 hs, luego se eliminó el inhibidor mediante lavados con medio de cultivo fresco y se reincubó por 24 hs adicionales, como se describió en la sección de materiales y métodos. A continuación se analizaron las estructuras de adhesión mediante inmunocitoquímica de doble marcado utilizando anticuerpos dirigidos contra vinculina y α -catenina.

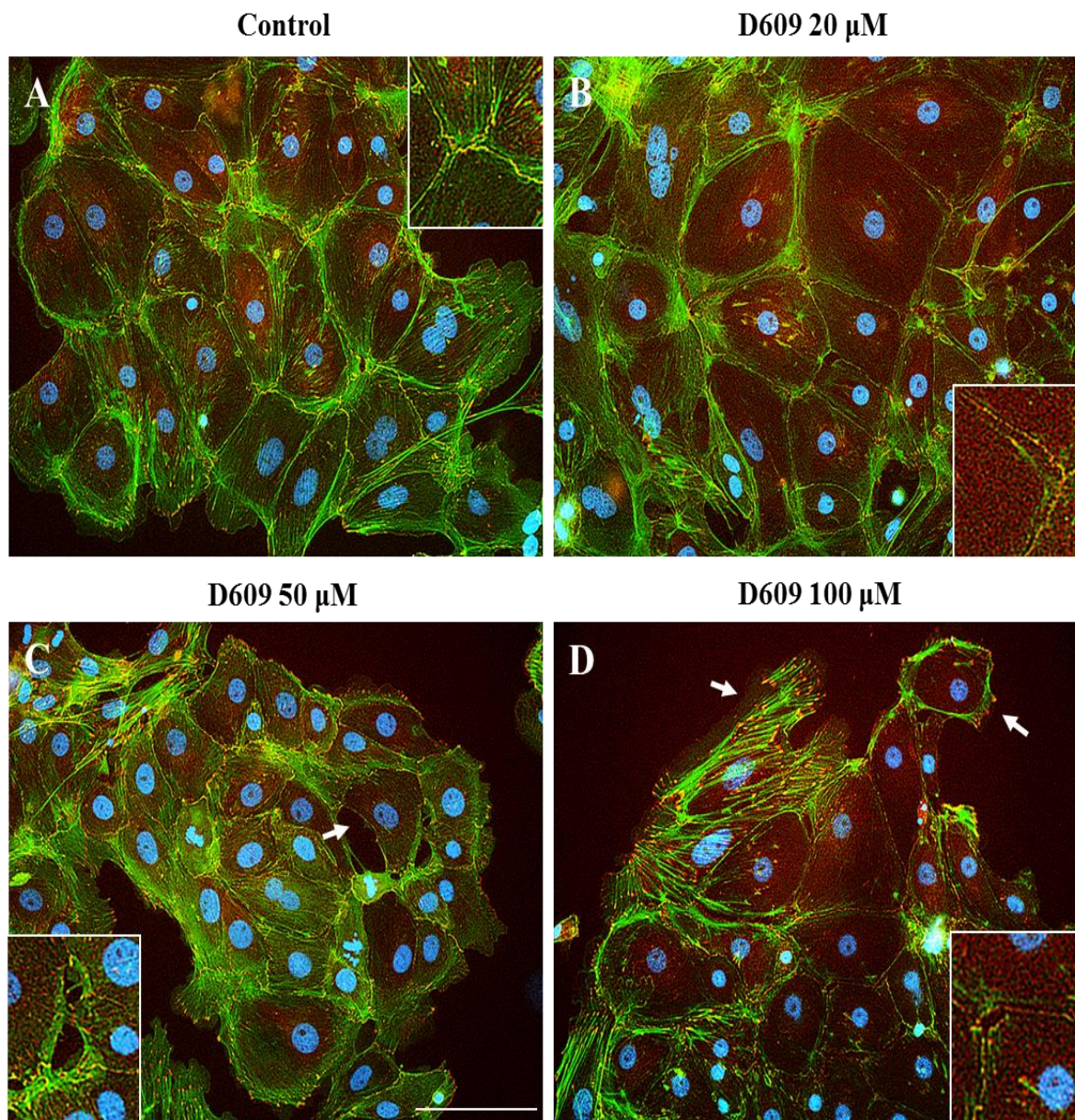


Figura 42- Efecto de la inhibición de las SMSs sobre el citoesqueleto de actina. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes del inhibidor D609 e inmunomarcadas con anticuerpos dirigidos contra vinculina (rojo) para detectar contactos focales y las uniones adherentes, y faloidina-FITC (verde) para marcar los filamentos de actina. Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33258 (azul). Los insertos muestran ampliaciones de algunas regiones de interés, donde se observa mejor la pérdida de la colocalización de las proteínas en el cinturón circunferencial, que en (A) aparece de color amarillo. La flecha en (C) señala una célula en proceso de separación, y en (D) células que han perdido la morfología epitelial. Imágenes captadas con un microscopio de fluorescencia convencional con objetivo de 40X. Barra 100 μm .

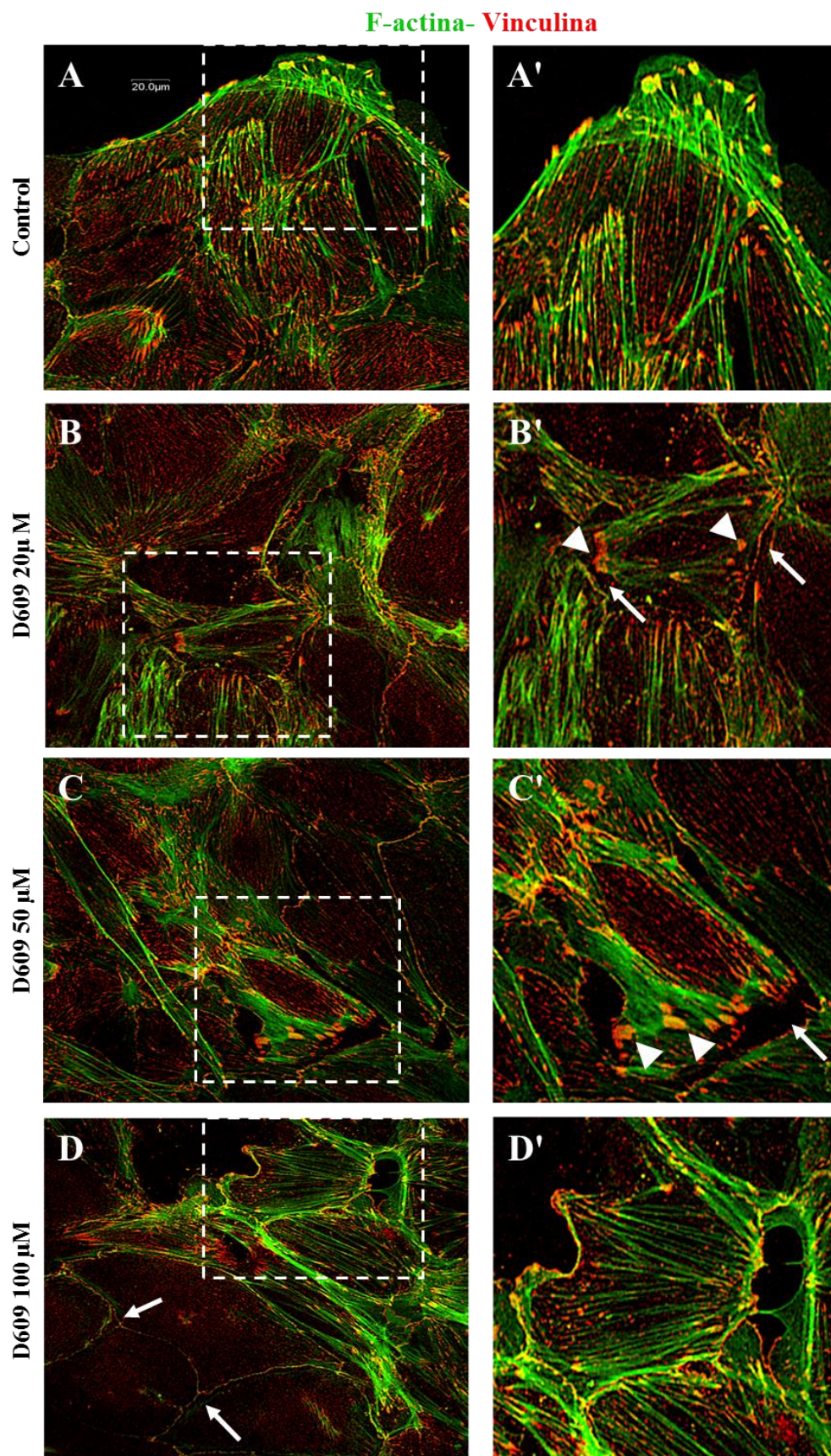


Figura 43- Efecto de la inhibición de las SMSs sobre las fibras de estrés. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes del inhibidor D609 e inmunomarcadas con un anticuerpo dirigido contra vinculina (rojo) para detectar contactos focales, y faloidina-FITC (verde) para marcar los filamentos de actina. Se muestran imágenes de microscopia confocal captadas con un objetivo de 60X, y ampliaciones de las zonas indicadas por recuadros. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes. Barra: 20 μ M.

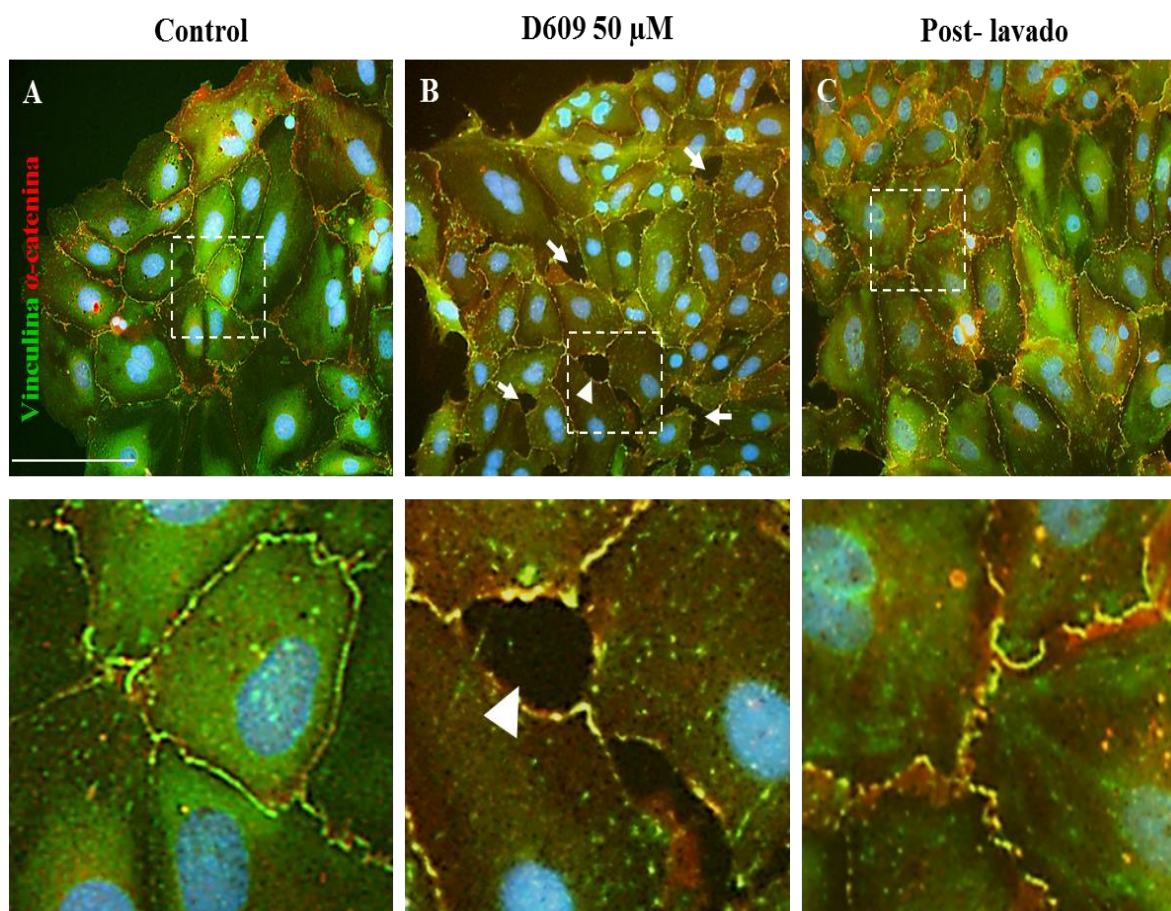


Figura 44- Estudio de la reversibilidad de los efectos producidos por la inhibición de las SMSs. Las células de túbulo colector en cultivo se incubaron con el inhibidor D609 (50 μ M) durante 24 hs, luego se lavaron con medio de cultivo fresco para remover el inhibidor y se reincubaron por 24 hs adicionales. Posteriormente los cultivos se inmunomarcaron con anticuerpos dirigidos contra vinculina (verde) y contra α -catenina (rojo). Los núcleos fueron coloreados con Hoechst 33258 (azul). Los insertos de (A) y (C) indican zonas de interés donde puede observarse la colocalización de las proteínas en los bordes de las células. El inserto en (B) corresponde a una ampliación de la región señalada con la flecha en donde se observan células en proceso de separación. Las imágenes se captaron con un microscopio de fluorescencia convencional con objetivo de 40X. Barra: 100 μ m.

En las células sin tratar, se observa la típica distribución de vinculina y α -catenina en los bordes celulares, donde colocalizan, reflejando la presencia de UA maduras (Figura 44A, ampliación). Contrariamente, en los cultivos primarios tratados con el inhibidor se observan entre las células espacios que se originan como consecuencia de la disipación de las proteínas que forman parte de las UA en los bordes celulares, como se describió previamente (Figura 44B, flechas). Es sabido que los filopodios son estructuras móviles que cumplen un papel importante en el reconocimiento celular, y en las células epiteliales participan en las primeras etapas de formación de las UA [28]. Es notable la ausencia de estas estructuras entre las células tratadas con el inhibidor (Figura 44B, punta de flecha en la ampliación). Luego de 24 hs de crecimiento en ausencia del inhibidor (post-lavado), se observa como las células recuperan las uniones célula-célula, como se refleja en la colocalización de ambas proteínas (Figura 44C, ampliación). Estos resultados demuestran, por un lado, que la inhibición farmacológica no provoca *per se* un efecto tóxico deletéreo sobre las células, y por otro, que una vez eliminada la inhibición de la actividad enzimática de las SMSs, y por ende la capacidad de síntesis de esfingomielina, las células recuperan la posibilidad de establecer las estructuras de adhesión intercelular ya descriptas.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA VINCULINA EN LOS TÚBULOS COLECTORES DE LA PAPILA RENAL

EL MODELO CELULAR DE ESTUDIO CONSERVA LAS CARACTERÍSTICAS DEL EPITELIO MADURO DEL CUAL PROVIENE

Los riñones tienen la función principal de formar la orina con el fin de regular el volumen de agua del organismo y eliminar metabolitos tóxicos. Para cumplir con esta función cuentan con un sistema de túbulos especializados. La concentración de la orina, que es el paso final de su formación, se produce en los túbulos colectores, que son de gran tamaño y se extienden desde la corteza hasta el final de la papila. El mantenimiento de la organización epitelial de los túbulos colectores es fundamental para el cumplimiento de sus funciones. Dado que el riñón es un órgano que presenta considerable heterogeneidad celular, sus aspectos funcionales resultan más sencillos de analizar *in vitro* [157]. Está descrito que las señales provenientes de la matriz extracelular son determinantes del proceso de polarización de los tejidos epiteliales [7]. Los cultivos primarios de células del túbulo colector de la papila renal tienen la capacidad de secretar su propia matriz extracelular y formar monocapas que mantienen la estructura epitelial por varios días, imitando el funcionamiento que presentan en el tejido intacto [75, 115, 146, 159, 160, 161]. Por esta razón, se eligió como modelo de estudio cultivos primarios de células del túbulo colector de la papila renal obtenidos de ratas adultas para continuar y profundizar los estudios que antecedieron a este trabajo de tesis. Los experimentos de la presente tesis doctoral fueron realizados sobre soportes de plástico o de vidrio aptos para cultivo, de superficie lisa (no porosa), sobre los cuales las células fueron sembradas sin el agregado de componentes de matriz. De esta manera las células fueron capaces de formar monocapas desarrolladas sobre la matriz extracelular que ellas mismas secretaron, tornando al modelo de experimentación más fisiológico.

Los estudios realizados para caracterizar el modelo celular se llevaron a cabo mediante la realización de cultivos primarios. Los resultados demostraron que el método de aislamiento de los túbulos colectores mediante centrifugación fue efectivo al observar los fragmentos tubulares mediante microscopía óptica de contraste de fases. Los cultivos primarios obtenidos después de sembrar estas muestras mostraron un crecimiento y características morfológicas típicas de las células epiteliales. La posterior marcación con anticuerpos específicos contra proteínas y el uso de lectinas que se unen a determinados glicoconjugados, permitió la caracterización fenotípica de las células de túbulo colector en el cultivo primario. El análisis demostró que las células que

conforman las monocapas presentan los glicoconjugados típicos que poseen las células de túbulo colector en la papila renal, que son reconocidos por la lectina DBA. También expresan citoqueratina-7 (CK-7), que constituye un marcador de células de estirpe epitelial, y forman uniones adherentes (UA) maduras, como lo refleja la marcación de vinculina en los bordes de las células. A partir de la doble marcación con anticuerpos se pudo distinguir dos poblaciones de células epiteliales: a) células totalmente diferenciadas que expresan CK-7 y vinculina, que exhiben marcación positiva intensa para DBA y negativa para BSL-I; y b) células que se encuentran en proceso de diferenciación que expresan CK-7 y vinculina, que exhiben marcación positiva débil para DBA y negativa para BSL-I. La marcación débil para DBA puede deberse a que estas células aún no expresan suficiente cantidad de glicoconjugados por ser más inmaduras.

El análisis del cilio primario, que es una estructura que se forma en el estadio final del proceso de diferenciación de la mayoría de las células epiteliales de los túbulos colectores renales [8], mostró una marcación positiva en las células que conforman las monocapas de los cultivos primarios.

Por lo tanto, los resultados demuestran la obtención exitosa de cultivos con características morfológicas y fenotípicas concordantes con células epiteliales. Además la formación de UA y la marcación positiva del cilio primario señala la conservación de las características del epitelio maduro del cual fueron obtenidas las células.

Un esquema resumen de estos resultados se muestra en la Figura 45.

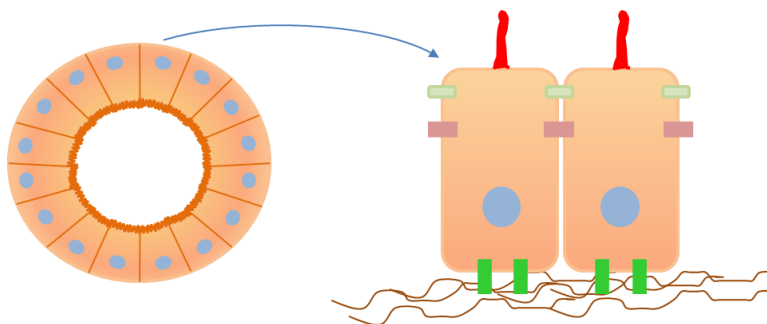


Figura 45- Esquema que representa los resultados del capítulo 1. Las células del TC en cultivo primario conservan las características de las células diferenciadas del tejido intacto del cual provienen, como es la formación de las UA y del cilio primario

LA BRADIQUININA INDUCE LA FORMACIÓN DE VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA

Se encuentra ampliamente aceptado que la molécula de vinculina se halla presente en todas las células formando un pool citosólico, en el cual adquiere una conformación cerrada, autoinhibida y soluble; y uno citoesquelético, representado por la vinculina que forma parte de

los contactos focales (CF) y de las uniones adherentes (UA) [55, 82]. En el plan de trabajo de la presente tesis se planteó como primer objetivo general profundizar el estudio del efecto de la bradiquinina (BK) sobre las estructuras de adhesión de las células a la matriz extracelular en células de túbulo colector de la papila renal. Para ello, se tomaron como base los resultados previos obtenidos por el grupo de investigación que permitieron el desarrollo de esta tesis. Se describió que la hormona intrarenal BK, en las células del túbulo colector de la papila renal, induce la remodelación de los CF con la consiguiente formación de vesículas que contienen vinculina y fosfatidilinositol-4,5-difosfato [146]. Al ser el primer trabajo que reporta la incorporación de vinculina en vesículas del citosol, se planteó como uno de los objetivos específicos de esta tesis la caracterización de las vesículas que contienen vinculina. Para lograr el aislamiento y posterior caracterización de las vesículas se implementó un método inmunomagnético.

Los resultados demostraron que el método de aislamiento inmunomagnético fue efectivo para la obtención de estructuras que se corresponden con vesículas pequeñas, como demostró el análisis mediante microscopía electrónica. La caracterización de las vesículas mediante Western Blot, obtenidas a partir del sobrenadante postnuclear de las células incubadas con BK, confirmó la presencia de vinculina en las vesículas, como así también en la fracción no unida a vesículas, lo que reveló que el pool citosólico se encuentra formado por vinculina asociada a vesículas y en su forma libre- autoinhibida.

La vinculina, al no ser una proteína transmembrana, sería lógico esperar que se asocie a la membrana de las vesículas en forma periférica. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron ensayos de extracción con alta concentración iónica, pH alcalino, separación de fases con Tritón X-114 y ensayos de protección a proteasas. Los resultados demostraron que vinculina se asocia con la membrana de las vesículas en forma periférica, orientada hacia el citosol, y a través de interacciones electrostáticas. Asimismo, el análisis del contenido de las vesículas mediante Western Blot demostró la ausencia de talina y paxilina, reforzando el concepto del efecto específico de la hormona intrarenal BK sobre los CF antes descripto, es decir, la restructuración, y no el desarmado de los mismos.

LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA TAMBIÉN PRESENTAN MARCADORES DEL COMPARTIMENTO DE RECICLAJE ENDOSOMAL

Las vesículas no se mueven de forma aleatoria en el interior de las células, sino que existen factores que se encargan de coordinar y asegurar la precisión entre la fusión de las membranas. Una familia de estos factores son las proteínas Rab GTPasas que se asocian de forma específica a la membrana de diferentes organelas [139, 140, 141]. Rab 5 se encuentra presente en la membrana de los endosomas tempranos [139, 143], en los cuales se han descripto dos poblaciones: una estática y una dinámica. La población dinámica madura rápidamente hacia endosomas tardíos, que posteriormente continúan hacia la vía de degradación que involucra a los lisosomas. Se encuentra aceptado que Rab 11 es un marcador de vesículas que provienen

del *trans* Golgi y de los endosomas del compartimento de reciclaje [139; 144]. Por otra parte, después de ser internalizado, el receptor de transferrina (RTf) es transportado a través de los endosomas tempranos y los de reciclaje [174], por lo que se usaron ambas moléculas como herramientas para visualizar estos compartimentos.

La caracterización bioquímica de las vesículas que contienen vinculina mediante Western Blot demostró la presencia de las proteínas Rab 5 y Rab 11, como así también del RTf. Los resultados obtenidos en trabajos previos, revelaron que la estimulación de las células del túbulo colector con BK induce una redistribución intracelular de vinculina sin cambio aparente en su contenido total [146]. A partir de este hallazgo surgió la idea de que, luego de disiparse de los contactos focales, la molécula de vinculina podrían incorporarse en vesículas Rab 5 positivas pertenecientes a la población estática de endosomas, cuya maduración es lenta [139, 143]. En el presente trabajo de tesis, sobre la base de los resultados expuestos, se planteó un modelo de la dinámica intracelular de vinculina, el cual se resume en el esquema de la Figura 46 y se describe a continuación.

En condiciones basales, existen dos poblaciones de vesículas que contienen vinculina: 1) una localizada muy cerca del núcleo cuya función sería de reservorio, y consistiría en un *circuito de tránsito restringido* de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, y 2) otra localizada en la zona marginal de la célula, que consistiría en un *circuito corto de reciclaje* de endosomas tempranos, cuya función sería participar del recambio basal de la vinculina asociada a los contactos focales. Del análisis conjunto de las imágenes de microscopía confocal, de los coeficientes de colocalización de Manders (MOC), y del nivel de contribución que tiene cada molécula en la colocalización (coeficientes K1 para vinculina, y K2 para Rab 5 o Rab 11) fue posible deducir las características de las vesículas que forman parte de estas dos poblaciones. La primera población estaría formada por vesículas Rab 5+ enriquecidas en vinculina ($K1 > K2$) proveniente de las síntesis *de novo* en el retículo endoplásmico, como lo demuestra la presencia de proteínas típicas de este compartimento detectadas por espectrometría de masa (calnexina y la ATPasa transicional del RE). Aunque no se analizó si Rab 5 y Rab 11 forman parte de la misma vesícula, se pudo comprobar que esta población también contiene vesículas Rab 11+ con un bajo contenido de vinculina ($K1 < K2$). La segunda población, el *circuito corto de reciclaje*, estaría representada por vesículas del compartimento de endosomas tempranos Rab 5+ (endosomas estáticos) y con bajo contenido de vinculina ($K1 < K2$), y a diferencia del pool de vesículas del *circuito de tránsito restringido*, no contienen Rab11 (MOC < 0,7, y el valor de K2 despreciable) (Figura 46A).

Cuando se estimulan las células con BK, ocurren dos fenómenos (Figura 46B). Por un lado, se disipa vinculina de los contactos focales, la que es captada por las vesículas preexistentes Rab 5+ que forman parte del circuito corto de endosomas estáticos, localizados en la región marginal, como lo demuestra el análisis del coeficiente K ($K1 > K2$), y adquieren Rab11 luego de los 5 min de estimulación (MOC > 0,7). Por lo tanto, después de la estimulación con BK, la molécula de vinculina pasaría a formar parte del compartimento de reciclaje endosomal. El incremento en la cantidad total de vinculina y Rab 11, y la disminución de Rab 5 en las vesículas luego de la estimulación con BK que se observó en el análisis de Western Blot,

concuera con esta interpretación. Además, el hecho de que en ambas regiones de las células, el nivel de contribución de vinculina en el proceso de colocalización se incrementa a cortos tiempos de estimulación con BK (K1>K2 para Rab5 y 11), refuerzan esta interpretación. Por otro lado, para compensar la disipación de vinculina de los contactos focales, se produce una movilización de vesículas del reservorio, desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, tal como lo reflejan las imágenes de microscopía confocal de las Figuras 28 y 29, para lograr reestablecer las condiciones basales. Esta interpretación es consistente con los resultados previos donde se observó una alta densidad de fluorescencia correspondiente a vinculina, concentrada en la región perinuclear, donde se localiza el compartimento de reciclaje [146]. Por este motivo, se concluye que la modulación que ejerce la BK sobre los contactos focales, es reversible. El proceso de movilización intracelular de vesículas conteniendo vinculina se ve claramente en las imágenes de microscopía confocal, en las cuales la gran acumulación de vesículas Rab 5+ en la zona cercana al núcleo, luego de la estimulación con BK, se dispersan hacia la membrana plasmática.

Los avances en proteómica y espectrometría de masa aplicados al estudio de proteínas han permitido la identificación de proteínas en tejidos específicos, células o incluso fracciones subcelulares [164]. En este trabajo se utilizó la Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masa/Espectrometría de Masa (LC-MS/MS) para identificar las proteínas de las células del túbulo colector de la papila renal que se encuentran asociadas o unidas a las vesículas que contienen vinculina. Para ello, las vesículas fueron purificadas mediante centrifugación diferencial y luego aisladas mediante un método inmunomagnético. La separación de las proteínas se realizó a través geles de SDS-PAGE con posterior tripsinización y análisis mediante LC-MS/MS.

El análisis logró identificar proteínas como α -actinina, que es una subunidad del complejo proteico CART (reciclaje o transporte asociado al citoesqueleto), el cual es necesario para el reciclado eficiente del RTf [181]. Por otra parte, también se identificó a miosina-9 en las vesículas que contienen vinculina. Esta proteína, que participa durante el movimiento celular, juega un papel importante en la reorganización del citoesqueleto, formación de contactos focales y retracción de los lamelipodios [182]. Aunque parece claro que vinculina al internalizarse se localiza en los endosomas de reciclaje, el análisis mediante LC-MS/MS de las vesículas aisladas demostró que estas también presentan proteínas residentes del retículo endoplasmático como calnexina y la ATPasa transicional del retículo endoplásmico. Esto demuestra que además de los endosomas de reciclado, las vesículas que contienen vinculina incluyen porciones del retículo endoplásmico. La proteína ATPasa transicional del retículo endoplásmico identificada mediante el análisis de LC-MS/MS se encuentra involucrada en la formación del retículo endoplásmico transicional [183]. La transferencia de membranas desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, que es un proceso dependiente de ATPasa, ocurre a través de vesículas de transición de 50-70 nm que derivan de elementos de transición del fragmento rugoso y del fragmento liso del retículo endoplásmico [183]. Por lo tanto, la presencia de esta proteína en las vesículas refuerza la interpretación de que vinculina se

incorpora a vesículas en la zona perinuclear, que constituyen el reservorio del *circuito de tránsito restringido*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un *modelo de distribución intracelular de vinculina* mediado por transporte vesicular: la vinculina cuando se encuentra presente en el citosol, se moviliza entre la conformación libre (soluble) y una asociada a vesículas, y la unión de la proteína a vesículas del *circuito de tránsito restringido* y al *circuito corto de reciclaje* permitiría que vinculina sea transportada finalmente a los sitios de armado de los complejos focales.

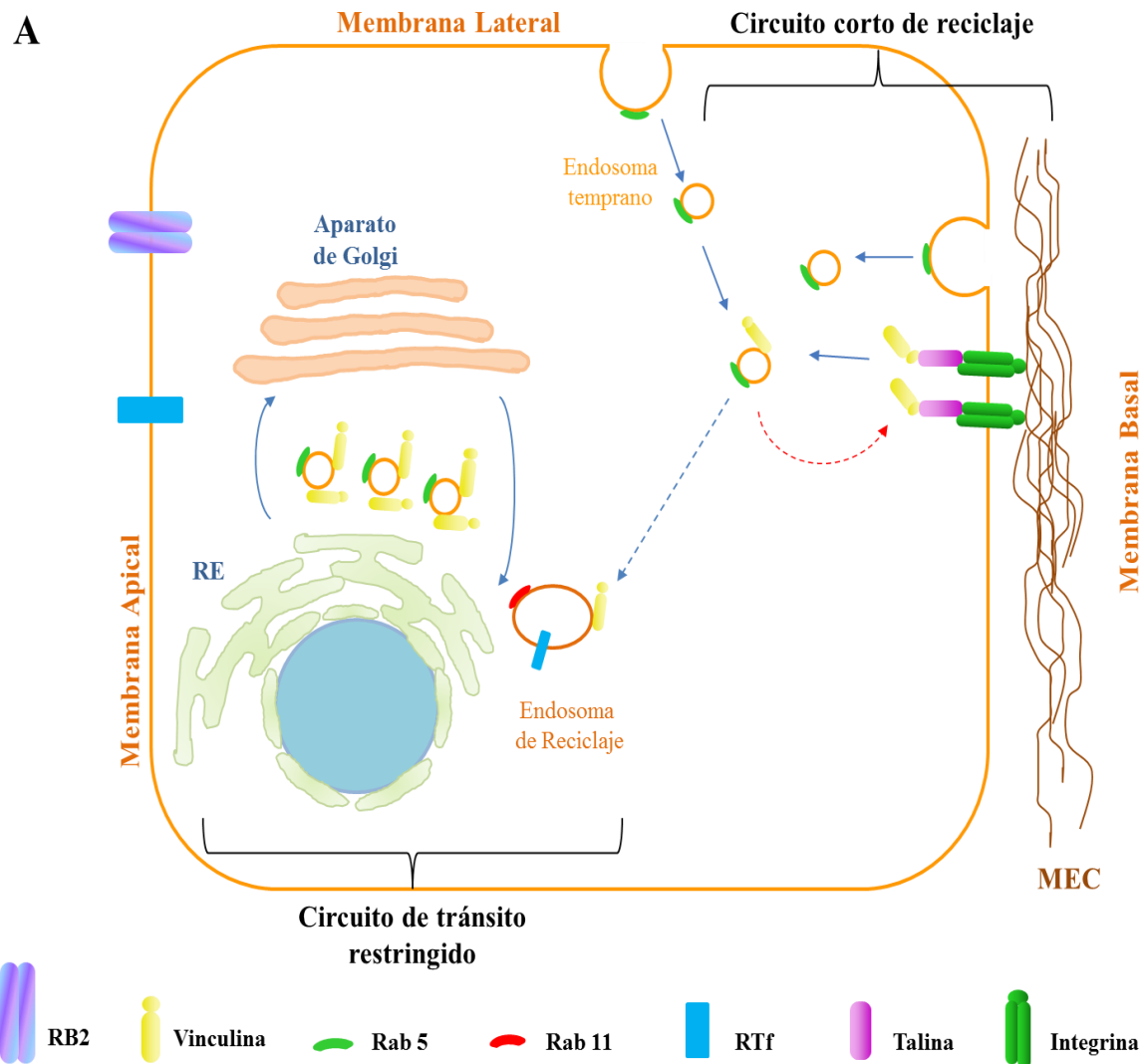


Figura 46-A) Esquema que representa el modelo de la dinámica intracelular de vinculina en condiciones basales. En el esquema se indican las proteínas que participan en el tráfico de las vesículas que contienen vinculina en condiciones basales. Se representan las vesículas que forman parte del *circuito de tránsito restringido*, y del *circuito corto de reciclaje*. RTf receptor de transferrina, MEC matriz extracelular, RB2 receptor B2 de bradiquinina, RE retículo endoplásmico

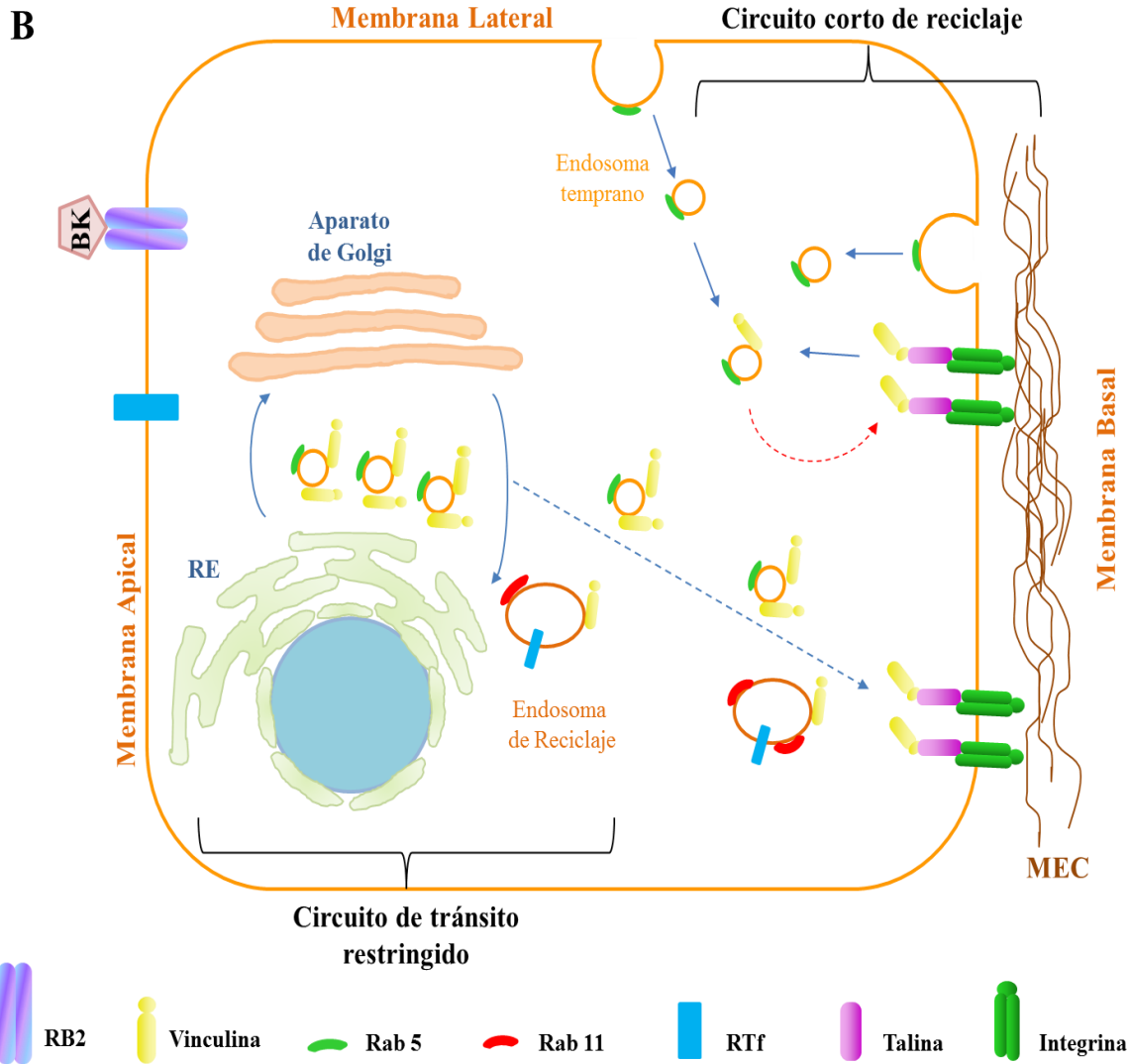


Figura 46-B) Esquema que representa el modelo de la dinámica intracelular de vinculina luego de la estimulación con bradiquinina. En el esquema se indican las proteínas que participan en el tráfico de las vesículas que contienen vinculina luego de la estimulación con bradiquinina (BK). Se representan las vesículas que forman parte del *circuito de tránsito restringido*, y del *circuito corto de reciclaje*. Después de la estimulación con BK, vinculina se disipa de los contactos focales y se asocia a vesículas Rab 5+ del *circuito corto de reciclaje*. Para reestablecer las condiciones basales, las vesículas del *circuito de tránsito restringido* se movilizan hacia la membrana plasmática para transportar vinculina hacia los sitios de formación de nuevos contactos focales que contienen vinculina. RTf receptor de transferrina, MEC matriz extracelular, RB2 receptor B2 de BK, RE retículo endoplásmico

LOS MICROTÚBULOS PARTICIPAN EN EL TRANSPORTE DE LAS VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA DURANTE EL PROCESO DE REARMADO DE LOS CONTACTOS FOCALES

Los contactos focales (CF) son estructuras dinámicas que se encuentran en reestructuración constante [46, 50, 52]. Los cambios dinámicos en la interacción de la célula con la matriz extracelular que la rodea son de importancia fundamental para numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la determinación de la forma y proliferación celular, la migración, remodelación de tejidos y diferenciación durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y en el mantenimiento de la integridad tisular [46, 50, 52, 68]. Es sabido que los microtúbulos son necesarios para la migración direccional de las células, y ha sido demostrado que se asocian a los CF en células migratorias como los fibroblastos [184]. En los trabajos previos que dieron lugar al desarrollo de esta tesis, se ha demostrado que la hormona intrarrenal BK induce una reestructuración de los CF al movilizar vinculina pero no talina, con la consiguiente formación de vesículas que contienen vinculina y componentes del compartimento de reciclaje endosomal [146]. Además, se demostró que la BK induce la reorganización del citoesqueleto de actina [75], y que el tratamiento previo de los cultivos primarios de células del túbulo colector de la papila renal con un agente despolimerizante del citoesqueleto de actina, citocalasina D, impide el rearmado de los CF a tiempos largos de estimulación con BK. Estos resultados sugieren que la formación de los CF, como así también el transporte de las vesículas que contienen vinculina hacia los sitios de la membrana plasmática donde ocurre este proceso, depende del citoesqueleto de actina [146]. Con el objeto de estudiar si los microtúbulos también participan en el rearmado de los CF, se realizaron cultivos primarios de células de túbulo colector y se estimularon con BK en presencia de colchicina, un agente despolimerizante de los microtúbulos.

Los resultados obtenidos demuestran que la preincubación de las células con colchicina no evita la disipación de vinculina de los CF, pero sí impide el rearmado de los mismos. En particular, se observan muy pocos CF a tiempos prolongados de estimulación con BK. Además, la alteración en el rearmado de los CF no permite que las células se adhieran de forma efectiva a la matriz extracelular, con la consiguiente pérdida de su morfología extendida y la adquisición de una forma redondeada, lo que les impediría establecer un correcto contacto célula-célula.

En células migratorias, la unión de los microtúbulos a los CF se ha relacionado con el proceso de desarmado de los mismos [71]. Se ha demostrado que el desarmado de los CF no consiste en el mecanismo inverso del armado, sino que ocurriría por un mecanismo de endo/exocitosis de la integrina mediado por miembros de la familia de Rab GTPasas, en el cual también estarían implicados los microtúbulos, dinamina y p125FAK [69, 70, 71, 72]. Además, los microtúbulos son los encargados de realizar el transporte de largo alcance de vesículas y organelas como los endosomas de reciclaje y endosomas tempranos, debido a la acción de proteínas motoras [154, 155]. Probablemente, los microtúbulos participen en el transporte de las vesículas que

contienen vinculina desde los endosomas tempranos Rab 5+ y el compartimiento de reciclaje endosomal (Rab 11/RTf +) hacia los sitios de armado de los CF. El pre-tratamiento con colchicina no permitiría la polimerización de los microtúbulos, y por lo tanto, no podrían transportar las vesículas que contienen vinculina a los sitios de armado de los CF, como normalmente ocurre a los 10 min de estimulación con BK en ausencia de colchicina. En coincidencia con esta interpretación, es importante resaltar que las células tratadas solo con colchicina presentan menor cantidad de CF que las células en ausencia del inhibidor, reflejando la participación de los microtúbulos en el mantenimiento de los CF en condiciones basales.

A modo de evidencia de que vinculina se moviliza según el *modelo dinámico* descrito en la sección anterior, el análisis mediante LC-MS/MS de las vesículas aisladas reveló la presencia de subunidades alfa y beta de tubulina asociadas a la membrana de las vesículas (*Tabla 1*, capítulo 3, sección 3.5). Se ha demostrado que el aislamiento de vesículas recubiertas de clatrina también presenta estas subunidades unidas a la membrana de las vesículas [185]. Debido a que el transporte intracelular de la mayoría de las vesículas se produce a través de los microtúbulos, es posible que la presencia de las subunidades de tubulina en las vesículas que contienen vinculina sean importantes para el transporte de las mismas hacia los sitios de rearmado o formación de los contactos focales. Por lo tanto, la incubación con colchicina estaría impidiendo el transporte de las vesículas hacia la membrana plasmática, lo que explica la escasa cantidad de CF en condiciones basales, y la falta de rearmado de los CF a los 10 min de incubación con BK.

En la Figura 47 se expone un esquema que resume los resultados de esta sección.

LA FORMACIÓN DE VESÍCULAS QUE CONTIENEN VINCULINA CON LAS CARACTERÍSTICAS DESCRIPTAS NO OCURRE CON AGENTES DESESTABILIZANTES DE MEMBRANA

En los antecedentes se estableció que los agentes que desestabilizan la membrana como la neomicina, que actúa sobre las membranas celulares secuestrando PIP₂, y metil-β-ciclodextrina (CDex), que provoca la disminución de colesterol en las membranas, inducen un cambio global en el perfil de fosfolípidos de los dominios de membrana DRM e incluso provocan la disipación de vinculina y talina de los CF sin posterior reconstitución de los mismos [113]. Con el objeto de estudiar si la formación de vesículas que contienen vinculina con las características descritas corresponde a un fenómeno específico inducido por la hormona BK o generalizado, se trataron células de túbulo colector en el cultivo primario con los agentes recién mencionados, que alteran la composición lipídica de la membrana.

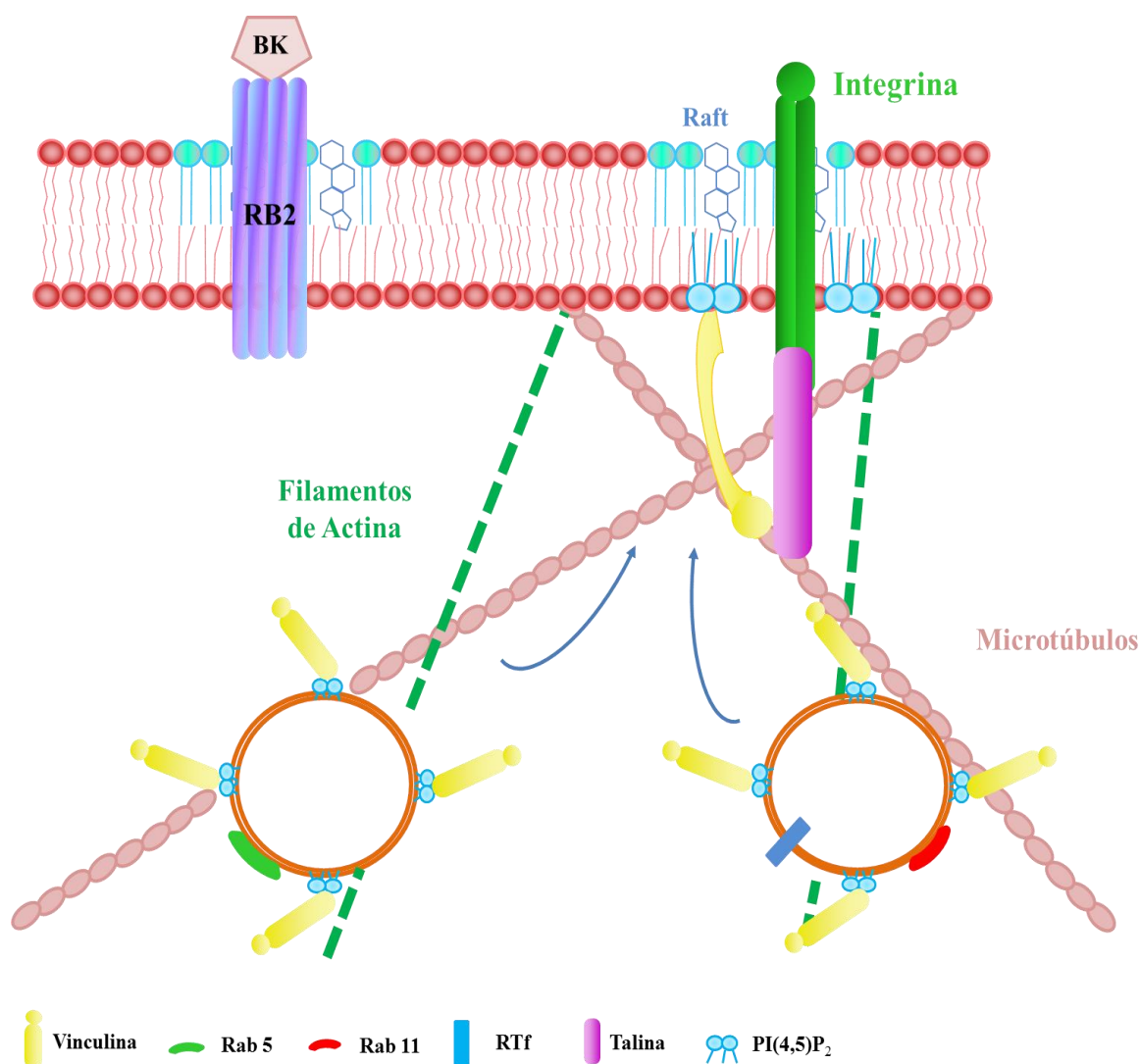


Figura 47- Esquema que representa la participación de los filamentos de actina y de los microtúbulos en el transporte de vesículas que contienen vinculina a los sitios de armado de los CF

Los resultados obtenidos han demostrado la aparición de estructuras vesiculares que contienen vinculina en el citosol después de tratar las células del túbulo colector con agentes desestabilizantes de la membrana. El análisis de las vesículas demostró la ausencia de Rab 5, Rab 11 y del RTf. Esto revela que las estructuras vesiculares formadas no derivan de los endosomas de reciclaje fisiológicos, como si lo hacen las vesículas que contienen vinculina que se forman luego de la estimulación con BK. Por lo tanto, interpretamos que probablemente estas vesículas representen estructuras que derivan de la vesiculización irreversible de la membrana plasmática, que ocurre como consecuencia de la alteración de los dominios *raft* como se reportó previamente [113]. Esta consideración es consistente con el efecto observado, en donde no se detectó el rearmado de los CF después del tratamiento con estos agentes.

PARTICIPACIÓN DE LA VINCULINA EN EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CELULAR EN LOS TÚBULOS COLECTORES DE LA PAPILA RENAL

LA ACTIVIDAD DE LAS SMSs ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA

Los esfingolípidos, a pesar de constituir una pequeña proporción de los lípidos de membrana, son un grupo de moléculas bioactivas cuya participación en procesos celulares es cada vez más relevante. Tomando como base las evidencias que indican que la organización de los tejidos epiteliales depende de la conservación de las estructuras de adhesión celular, y que en células del túbulo colector, las proteínas que conforman a las uniones adherentes (UA) y a los contactos focales (CF) se localizan en microdominios *raft* enriquecidos en colesterol y esfingomielina (SM), cuya composición es esencial para el mantenimiento de las mismas [113, 114, 115], surgió la hipótesis de que la actividad de las enzimas que sintetizan SM podría cumplir un papel importante en el mantenimiento de las estructuras de adhesión celular, de las cuales depende el mantenimiento de la organización de los tejidos. Para comprobar la hipótesis se llevó a cabo la investigación y se tomó como modelo de estudio cultivos primarios de células del túbulo colector de la papila renal, que preservan las características de un epitelio diferenciado (Capítulo 1, Resultados).

Aunque se han realizado varios estudios que demuestran que tanto la inhibición farmacológica como el silenciamiento génico de las enzimas esfingomielina sintasas (SMSs) altera la composición de los *raft* lipídicos [133, 134], y que también puede impedir la formación de UA maduras durante el proceso de diferenciación de las células MDCK [135], no se ha estudiado el efecto que produce la inhibición de estas enzimas en epitelios ya diferenciados y maduros. Para analizar la participación de la actividad de las SMSs en el mantenimiento de las UA, las células fueron incubadas inicialmente con un inhibidor farmacológico de ambas isoformas de la SMS, la SMS1 y SMS2, denominado D609. El análisis mediante microscopía confocal y convencional de las cultivos demostró que la actividad de las enzimas cumple un rol importante en el mantenimiento de las UA. La inhibición farmacológica indujo la alteración en la distribución de las proteínas que conforman al complejo proteico de las UA. Con el objeto de corroborar que las alteraciones observadas en las células se debían a la inactivación de las enzimas y no a un efecto deletéreo del agente farmacológico utilizado, se realizó el silenciamiento génico de las dos isoformas de la enzima utilizando siRNAs específicos. Teniendo en cuenta que las UA son estructuras proteicas que residen en la membrana plasmática, sería lógico pensar que la acción de la SMS2 (isoforma presente en la membrana plasmática) sería la más importante para el mantenimiento de estas estructuras. Pero contrariamente a lo esperado, no se observaron cambios significativos en la distribución de α -

catenina en los bordes de las células transfectadas con el ARN de interferencia específico para la SMS2. Cuando las células se incubaron con el ARN de interferencia específico para la SMS1 (isoforma presente en el aparato de Golgi), se observó alteración en la distribución de α -catenina, con la consiguiente aparición de espacios intercelulares. Este resultado no solo confirmó la participación de la actividad de las enzimas que sintetizan SM en el mantenimiento de las UA, sino que incluso demostró, en coincidencia con estudios realizados en células MDCK [135], que la actividad de la SMS1 sería la más importante para el mantenimiento y/o formación de las UA. Puesto que los resultados observados de la inhibición farmacológica y del silenciamiento génico de la SMS1 son morfológicamente similares, el agente D609 probablemente actúe inhibiendo principalmente a la SMS1. Debido a que la SMS1 se localiza en el aparato de Golgi, y su actividad es esencial para la formación de vesículas, las alteraciones observadas sobre las UA podrían deberse a las modificaciones en la formación de vesículas que participan en el proceso de transporte y reciclado de los complejos de UA.

Con el objeto de investigar si las alteraciones en las uniones célula-célula provocadas por el inhibidor farmacológico, se debían a una disminución de la síntesis de las proteínas que conforman las UA, se realizó el estudio de las mismas mediante Western Blot. El análisis no mostró disminución en los niveles de estas proteínas, demostrando que las alteraciones observadas sobre las UA no se corresponderían a una disminución en la cantidad de las mismas.

LA ACTIVIDAD DE LAS SMSs NO ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS DE ADHESIÓN CÉLULA-MATRIZ EXTRACELULAR

Los CF son estructuras jerárquicas formadas por la unión secuencial de varias proteínas [47, 48, 49, 50], que permiten el armado y desarmado de los CF, lo que constituye el proceso de remodelación que le da plasticidad a las células. Teniendo en cuenta que en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, utilizando cultivos primarios de células del túbulo colector, se demostró que la acción de un agente fisiológico como la hormona BK es capaz de inducir la remodelación de los CF en forma reversible [75], y que este efecto no se repite al tratar las células con agentes químicos que alteran la composición lipídica de la membrana plasmática [113, 114]; se investigó el efecto que produce sobre los CF la inhibición de la actividad de las enzimas SMS1 y 2, que participan de la síntesis de un componente esencial de los dominios raft, la SM. El análisis demostró que en las células incubadas con el inhibidor, tanto vinculina como talina continúan formando parte de los CF, e incluso se produce un aumento en el número de CF que contienen vinculina, de acuerdo a los datos obtenidos en el análisis cuantitativo. La activación y unión de talina a la integrina para iniciar la formación del complejo focal, depende de la presencia local de PI4P [61]. Aunque la molécula de talina, junto con PIP₂, han sido señalados como las principales moléculas que reclutan a vinculina a los sitios de armado de los CF, también se ha reportado que vinculina puede asociarse a paxilina [57], la cual se une de forma directa a la integrina. El aumento en el número de CF que contienen vinculina, y no

talina, podría deberse a la capacidad de unión de vinculina a paxilina, probablemente en sitios primordiales de armado de los CF. Tanto el aumento del número de CF que contienen vinculina como el aumento del tamaño de los mismos en las células del interior de la colonia, posiblemente se deban a un mecanismo compensatorio de las células ante la disolución de las uniones intercelulares, con el fin de mantenerse adheridas a la matriz extracelular, y de esta forma asegurar su supervivencia.

LA ACTIVIDAD DE LAS SMSs REGULA LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

El citoesqueleto de actina que es fundamental para el mantenimiento de la morfología celular [93], cumple un papel importante en la adhesión de las células con la matriz extracelular, debido a su directa unión con proteínas de los CF. Por lo tanto, el análisis del efecto que podría ejercer la inhibición de la actividad de las SMSs sobre el citoesqueleto de actina fue de importancia para completar los resultados obtenidos hasta el momento. El análisis demostró una alteración en el cinturón circunferencial de actina en las células después de ser incubadas con el inhibidor, en concordancia con los resultados previos, en donde la disipación de proteínas que conforman a las UA, provocó la separación e incluso contracción celular. Las fibras de estrés por su asociación a los CF cumplen un papel importante en la adhesión de las células al medio extracelular [93]. La incubación de las células del túbulo colector con el inhibidor D609 provocó una reorganización de las fibras de estrés, con un predominio de las fibras de estrés ventrales, que son cortas y se asocian a CF en ambos extremos, tanto en las células del interior de la colonia como en las periféricas. Este hecho se correlaciona con el incremento del número de CF que contienen vinculina en las dos poblaciones celulares, y les permitiría a las células mantener su morfología extendida como se indicó en la sección 2.1 (Figura 40B, flechas e inserto). Se ha descrito que las fibras de estrés ventrales pueden formarse a partir de fibras de estrés dorsales preexistentes debido a la reorganización de su estructura [93] y que vinculina puede promover la modificación de los filamentos de actina [91]. Por lo tanto, la molécula de vinculina mediaría la organización de las fibras de estrés ventrales para favorecer la formación de un mayor número de CF después de incubar las células con el inhibidor D609, como un mecanismo compensatorio en la cual las células actuarían rápidamente remodelando sus componentes del citoesqueleto con el fin de asegurar su supervivencia.

EL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LAS SMSs ES REVERSIBLE

Para evaluar la reversibilidad de los efectos producidos por la inhibición farmacológica de las SMSs sobre las uniones intercelulares, después de incubar las células con el D609 durante 24 hs, se eliminó del medio el inhibidor y se reincubaron durante 24 hs adicionales. Este estudio demostró que el inhibidor de las SMSs, D609, no provoca cambios irreversibles en las células, puesto que en el tiempo adicional que se mantuvieron en cultivo, las células fueron capaces de restituir la monocapa debido a la recuperación de las UA, como se muestra en la Figura 44C.

Nuestra interpretación es que en ausencia de la actividad de la SMS1 el transporte vesicular del complejo de unión adherente desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática se ve afectado, posiblemente por la formación de vesículas que no resulten adecuadas para la correcta inserción de las proteínas de la UA. Una vez reestablecida la actividad de la SMS1, se formarían las vesículas con las condiciones fisicoquímicas adecuadas para la inclusión de las proteínas del complejo adherente. Esto explicaría la recuperación de las uniones intercelulares que se observa luego de 24 hs de crecimiento en ausencia del inhibidor.

CONCLUSIONES GENERALES DE LAS EVIDENCIAS EXPUESTAS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral permitieron demostrar que el pool citosólico de vinculina está compuesto por una forma soluble de la proteína, y otra asociada a vesículas, las que también contienen marcadores del compartimiento endosomal (Rab 5) y de reciclaje (Rab 11 y RTf). Y el hecho de que las vesículas no contengan talina y paxilina, confirma el efecto modulador, y no de desarmado, que ejerce de la hormona intrarenal bradiquinina sobre los contactos focales en las células de túbulo colector de la papila renal.

El análisis de las vesículas a través de LC-MS/MS evidencia la presencia de proteínas que participan en el transporte de vesículas mediado por el citoesqueleto de actina, como α -actinina y miosina-9; y también proteínas de los microtúbulos (subunidades alfa y beta de tubulina). La identificación de componentes del citoesqueleto de actina y microtúbulos, como así también de las proteínas Rab 5 y Rab 11 en las vesículas que contienen vinculina, se correlaciona con los resultados que demuestran que el rearmado de los contactos focales que se observa a tiempos largos de estimulación con bradiquinina, depende tanto de la presencia de los filamentos de actina como de los microtúbulos.

Adicionalmente, la detección mediante LC-MS/MS de proteínas residentes del retículo endoplasmático como calnexina y la ATPasa transicional en las vesículas, en conjunto con los resultados obtenidos de las imágenes de microscopía confocal, análisis de colocalización (MOC y K), y Western Blot de las proteínas Rab 5, Rab 11 y vinculina, permitieron proponer un modelo dinámico de distribución intracelular de vinculina mediado por transporte vesicular. En

este modelo se plantean dos circuitos de tránsito, circunscriptos a determinadas regiones de la célula. Las vesículas de la región marginal participarían del recambio basal de vinculina presente en los contactos focales, y las de la región perinuclear, constituiría el reservorio de la molécula, y se movilizaría ante un estímulo que demande la llegada de vinculina a los sitios de armado de los contactos focales, como ocurre durante su reestructuración inducida por bradiquinina.

A pesar de que, tanto las proteínas que forman parte de los contactos focales como de las uniones adherentes se localizan en dominios raft enriquecidos en esfingomielina, la inhibición de la actividad de la esfingomielina sintasa solo afecta la unión célula-célula. Se comprobó que el mantenimiento de las uniones adherentes es dependiente de la actividad de una de las isoformas de la enzima, la esfingomielina sintasa 1, que se localiza en el aparato de Golgi y participa en la *síntesis de novo* de esfingomielina. Esto indicaría que la inhibición de la enzima provoca una alteración en las características fisicoquímicas de la membrana de las vesículas con la consecuente alteración en la inserción y transporte de las proteínas que forman parte de las uniones adherentes, puesto que se sabe que E-cadherina y β -catenina viajan desde el aparato de Golgi hacia la membrana formando un complejo (25). Ante la falta de E-cadherina y β -catenina en la membrana plasmática, el resto de las proteínas del complejo no se pueden ensamblar, ni tampoco se pueden asociar los filamentos de actina para formar el cinturón circunferencial y como consecuencia, las células se separan.

El mantenimiento de los contactos focales demostró no ser dependiente de la actividad de la esfingomielina sintasa 1, y la respuesta ante la inhibición de la enzima fue un aumento en cantidad y tamaño de los mismos. Estos resultados demuestran que el transporte vesicular de vinculina no estaría afectado por la inhibición de la enzima. Probablemente este fenómeno se deba a que la molécula de vinculina se asocia a vesículas del sistema endosomal, provenientes de la membrana plasmática, donde la actividad de la esfingomielina sintasa 2 podría compensar la inhibición de la isoforma presente en el aparato de Golgi. Además, para permanecer asociada a la membrana formando parte de los CF, la vinculina necesita de la presencia de PIP₂ [58], cuya síntesis local se encuentra asegurada por la presencia de talina, puesto que esta proteína porta a la enzima PI4P-5K tipo I γ que promueve la síntesis local de PIP₂, a partir de PI4P [62, 63]

Los cambios dinámicos en la interacción de la célula con la matriz extracelular que la rodea son de importancia fundamental, por tanto, la remodelación de las fibras de estrés que acompañan al aumento del número de contactos focales que contienen vinculina demuestra la plasticidad que tienen las células de responder y reorganizar sus componentes ante determinados estímulos. Se ha descrito en células migratorias, que la vida media de la integrina en los contactos focales depende del tamaño de estos complejos proteicos, y puede variar de algunos segundos hasta largos períodos de tiempo [73, 74]. También se sabe que la unión de vinculina a talina refuerza y estabiliza al complejo focal en formación, lo que reduce el reciclado de integrina y favorece el consiguiente crecimiento de los mismos [60]. Estos datos aportan mayor evidencia al papel que cumple vinculina en el mantenimiento de los contactos focales ante la inhibición farmacológica de la esfingomielina sintasa 1. En este contexto, la molécula de vinculina sería

transportada a la membrana plasmática por vesículas Rab 5/Rab 11+, y la asociación de vinculina a talina estabilizaría a la integrina en los complejos focales en formación, prolongando la vida media de los mismos y, evitando de esta forma, que las células se despeguen de la matriz extracelular y mueran por *anoikis*.

PROYECCIÓN FISIOPATOLÓGICA DE LAS EVIDENCIAS EXPUESTAS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Como se mencionó en la introducción, el establecimiento de las estructuras de adhesión celular constituye una etapa fundamental en el proceso de organización tisular, en el cual, la adhesión célula-matriz, a través de la formación de contactos focales, precede a la unión célula-célula, representada por las uniones adherentes. Los cambios dinámicos en la interacción de la célula con la matriz extracelular que la rodea son de importancia fundamental para numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la determinación de la forma y proliferación celular, la migración, remodelación de tejidos y diferenciación durante el desarrollo embrionario, cicatrización de heridas y en el mantenimiento de la integridad tisular [46, 50, 52, 68]. Pero también subyace a la progresión de un amplio espectro de patologías, incluyendo la metástasis de células cancerosas, la aterosclerosis, y la hipertrofia cardíaca, así como desordenes de tipo fibróticos y neurodegenerativos [50].

El ciclo de síntesis y degradación de esfingomielina ha sido ampliamente estudiado en neuronas debido a que son las células que contienen el mayor porcentaje de este esfingolípido. El aumento de la síntesis de esfingomielina por sobreexpresión del gen de la esfingomielina sintasa 1 se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades como Alzheimer [186], mientras que un aumento de la cantidad de esfingomielina, por una falta de degradación por acción de las enzimas lisosomales esfingomielinasas, se encuentra asociado con enfermedades como la de Niemann-Pick [187]. Los resultados de la presente tesis doctoral permitieron demostrar que la regulación de la actividad de la esfingomielina sintasa 1 también es muy importante para regular el mantenimiento de la organización tisular de los túbulos colectores de la papila renal, puesto que la inhibición de su actividad provoca la alteración de las uniones intercelulares. Por lo tanto, la inhibición de la esfingomielina sintasa 1 provocaría un retorno a la etapa inicial del proceso de organización tisular, que es la formación de los contactos focales con el fin de mantener a las células adheridas a la matriz extracelular y de esta forma asegurar su supervivencia.

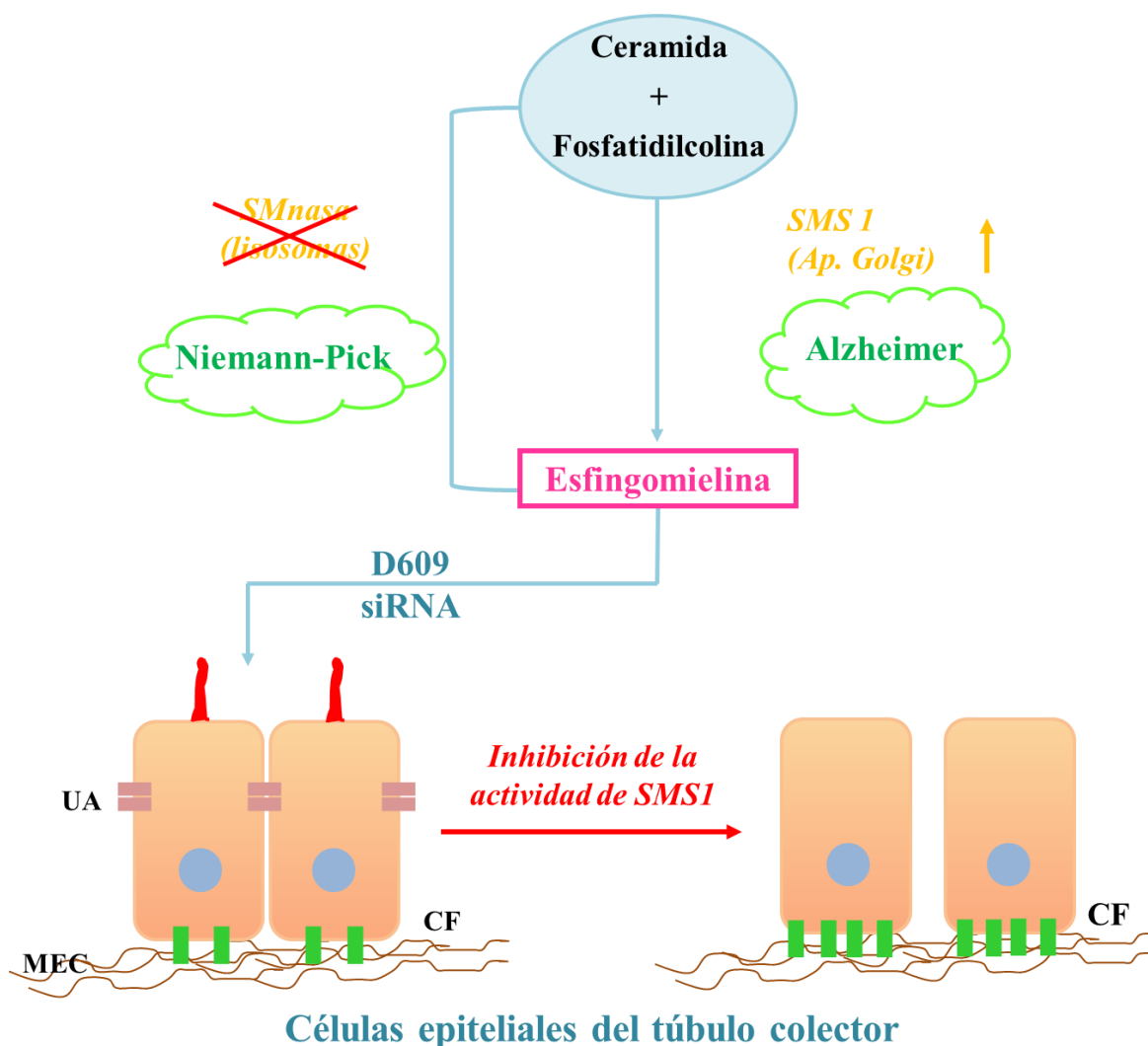


Figura 48. Proyección fisiopatológica de las evidencias expuestas en la presente tesis doctoral. La sobreexpresión la esfingomielina sintasa 1 (SMS1) se asocia a la enfermedad de Alzheimer en las neuronas; y la inhibición de la actividad de la SMS 1 en las células del túbulo colector provocaría el retorno a la etapa inicial del proceso de organización tisular. CF contactos focales, UA uniones adherentes, MEC matriz extracelular

Esta proyección fisiopatológica pone en evidencia la importancia de esclarecer los mecanismos involucrados en el mantenimiento y modulación de las estructuras de adhesión celular, puesto que son esenciales para la formación y funcionamiento de los tejidos. Por otro lado, el modelo propuesto de distribución de vinculina asociada a vesículas para ser transportada a los sitios de armado de los contactos, aporta nueva evidencia al continuo intento por describir los mecanismos que utilizan las células para regular la dinámica intracelular de esta proteína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stevens, A., Lowe, J.S. *Texto y atlas de histología*. Mosby, 1992. Capítulo **16**.
2. Geneser, F. *Histología-sobre bases moleculares*. Panamericana, 2000. 3ra edición: Cap. **20**.
3. Cullen-McEwen, L., Sutherland, M.R., Black, M.J. *The Human Kidney: Parallels in Structure, Spatial Development, and Timing of Nephrogenesis*. Int. Dev., 2016. Chap **3**: p. 27-40.
4. Roh, M.H. and Margolis B. *Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization*. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2003. **285**(3): p. F377-87.
5. Mostov, K., Su, T., ter Beest, M. *Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity*. Nat. Cell Biol., 2003. **5**(4): p. 287-93.
6. Lubarsky, B. and Krasnow, M.A. *Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes*. Cell, 2003. **112**(1): p. 19-28.
7. Hogan, B.L., Kolodziej, P. *Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis*. Nat. Rev. Genet., 2002. **3**(7): p. 513-23.
8. Bacallao, R. *The subcellular organization of Madin-Darby canine kidney cells during the formation of a polarized epithelium*. J. Cell Biol., 1989. **109**(6 Pt 1): p. 2817-32.
9. Meder, D. *Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells*. J. Cell Biol., 2005. **168**(2): p. 303-13.
10. Praetorius, H.A., Spring, K.R. *A physiological view of the primary cilium*. Annu. Rev. Physiol., 2005. **67**: p. 515-29.
11. Pazour, G.J., Witman, G.B. *The vertebrate primary cilium is a sensory organelle*. Curr. Op. Cell Biol., 2003. **15**(1): p. 105-10.
12. Satir, P., Christensen, S.T. *Overview of structure and function of mammalian cilia*. Annu. Rev. Physiol., 2007. **69**: p. 377-400.
13. Gumbiner, B.M. *Regulation of cadherin adhesive activity*. J. Cell Biol., 2000. **148**: p. 399-403.
14. Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P.F., Lecuit, T. *A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin*. Nature, 2008. **453**: p. 751-756.
15. Meng, W., Takeichi, M. *Adherens junction: Molecular architecture and regulation*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2009. **1**(6): a002899.
16. Rashmi, P., Yap, A.S. *Active Tension: The Role of Cadherin Adhesion and Signaling in Generating Junctional Contractility*. Curr. Top Develop. Biol., 2015. **112**: p. 65-102.
17. Nelson, W.J. *Epithelial Cell Polarity from the Outside Looking In*. Phys, 2003. **18**: p. 143-146.
18. Guillot, C. and Lecuit, T. *Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis*. Science, 2013. **340**: p.1185-1189.
19. Briehar, W.M., Yap, A.S. *Cadherin junctions and their cytoskeleton(s)*. Curr. Op. Cell Biol., 2013. **25**:p. 39-46.
20. Baum, B., Georgiou, M. *Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodelling*. J. Cell Biol., 2011. **192**: p. 907-917.
21. Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E. *Sticky Business: orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, 2003. **112**: p. 534-548.
22. Angst, B.D., Marcozzi, C., Magee, A.I. *The cadherin superfamily: diversity in form and functions*. J. Cell Sci., 2000. **114**: p. 629-641.

23. Huber, H.A. and Weis, W.I. *The structure of the β -catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by β -catenin*. Cell, 2001. **105**: p. 391-402.
24. Weis, W.I. and Nelson, J. *Re-solving the cadherin–catenin–actin condrum*. J. Biol. Chem., 2006. **24**: p. 35593-35597.
25. Chen, Y.T., Steward, D.B., Nelson, W.J. *Coupling assembly of the E-cadherin/ β -catenina complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane tarjeting of E-cadherin in polarized MDCK cells*. J. Cell Biol., 1999. **144**: p. 687-699.
26. Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y. *α -catenin–Vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells*. J. Cell Biol., 1998. **142**: p. 847-857.
27. Palovuori, R., Eskelinen, S. *Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDCK cells*. Eur. J. Cell Biol., 2000. **79**: p. 961-974.
28. Vasioukhin, V., Bauner, C., Yin, M., Fuchs, E. *Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion*. Cell, 2000. **100**: p. 209-219.
29. Kovacs, E.M., Verma, S., Ali, R.G., Ratheesh, A., Hamilton, N.A., Akhmanova, A. *N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a noncanonical post-nucleation pathway*. Nat. Cell Biol. 2011. **13**(8): p. 934–943.
30. Smutny, M., Cox, H.L., Leerberg, J.M., Kovacs, E.M., Conti, M.A., Ferguson, C. *Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens*. Nat. Cell Biol., 2010. **12**(7): p. 696–702.
31. Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., Nelson, W.J. *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889–901.
32. Zhang, J., Betson, M., Erasmus, J., Zeikos, K., Bailly, M., Cramer, L.P. *Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations*. J. Cell Sci., 2005. **118**(23): p. 5549–5562.
33. Haviv, L., Gillo, D., Backouche, F., Bernheim-Groswasser, A. *A cytoskeletal demolition worker: myosin II acts as an actin depolymerization agent*. J. Mol. Biol., 2008. **375**(2): p. 325–330.
34. Reymann, A.C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.L., Guerin, C., Cao, W.X., Chin, H.F. *Actin network architecture can determine myosin motor activity*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1310–1314.
35. Wu, S.K., Gomez, G.A., Michael, M., Verma, S., Cox, H.L., Lefevre, J.G. *Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia*. Nat. Cell Biol., 2014. **16**(2): p. 167–178.
36. Lecuit, T. and Yap, A.S. *E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics*. Nat. Cell Biol., 2015. **17**: p. 533-539.
37. Miyoshia, J., Takai, Y. *Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2005. **57**: p. 815 – 855.
38. Bhushan, V.D., Harmon, R.M., Green, K.J. *Desmosomes at a glance*. J. Cell Sci., 2009. **122**: p. 4401–4407.
39. Gumbier, B., Stevenson, B., Grimaldi, A. *The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex*. J. Cell Biol., 1988. **107**: p. 1575-1587.
40. Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V., Fuchs, E. *Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium*. Dev. Cell, 2002. **3**: p. 367–381.

41. Kobiela, A. and Fuchs, E. *α -Catenin: At the Junction Of Intercellular Adhesion And Actin Dynamics*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2004. **5**: p. 614-625.
42. Perez-Moreno, M., Avila, A., Islas, S., Sanchez, S., Gonzalez-Mariscal, L. *Vinculin but not α -actinin is a target of PKC phosphorylation during junctional assembly induced by calcium*. J. Cell Sci., 1998. **111**: p. 3563-3571.
43. Nagafuchi, A. *Molecular architecture of adherens junctions*. Curr. Op. Cell Biol., 2001. **13**: p. 600-603.
44. Bays, J.L., Peng, X., Tolbert, C.E., Guilluy, C.H., Angell, A.E., Pan, Y., Superfine, R., Burridge, K., DeMali, K.A. *Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions*. J. Cell Biol., 2014. **205**: p. 251-263.
45. Ando-Akatsuka, Y., Yonemura, S., Itoh, M., Furuse, M., Tsijita, S. *Differential behaviour of E-cadherin and occludin in their colocalization with ZO-1 during the establishment of epithelial cell polarity*. J. Cell Physiol., 1996. **179**: p. 115 – 125.
46. Adams, J.C. *Cell-matrix contact structures*. Cell Mol. Life Sci., 2001. **58**: p. 371-392.
47. Geiger, B. *A 130K Protein from Chicken Gizzard: Its Localization at the Termini of Microfilament Bundles in Cultured Chicken Cells*. Cell, 1979. **18**: p. 193-205.
48. Bass, M., Patel, B., Barsukov, I.G., Fillingham, I.J., Mason, R., Smith, B.J., Bagshaw, C.R. Critchley, D.R. *Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin*. Biochem J., 2002. **362**: p. 761-768.
49. Critchley, D.R. *Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion*. Biochem. Soc. Transact., 2004. **32**: p831-836.
50. Yu JA, Deakin NO and Turner CE. *The Focal Adhesion: A Network of Molecular Interactions*. Handbook of Cell Signaling, 2010. Three-Volume Set 2 ed. Chapter 156
51. Geiger B, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ. *Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1980. **77** (7): p4127-4131.
52. Critchley, D.R. *Focal adhesions - the cytoskeletal connection*. Curr. Op. Cell Biol., 2000. **12**: p. 133-139.
53. Thompson, P.M., Tolbert, C.E., Shen, K., Kota, P., Palmer, S.M., Plevock, K.M., Orlova, A., Galkin, V.E., Burridge, K., Egelman, E.H., Dokholyan, N.V., Superfine, R., Campbell, S.L. *Identification of an Actin Binding Surface on Vinculin that Mediates Mechanical Cell and Focal Adhesion Properties*. Structure, 2014. **22**: p. 697-706.
54. Case, L.B., Baird, M.A., Shtenge, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., Waterman, C.M. *Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions*. Nat. Cell Biol., 2015. **17**: p. 880-894.
55. Johnson, R.P. and Craig, S.W. *An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 12611-12619.
56. Johnson, R.P. and Craig, S.W. *F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains*. Nature, 1995. **373**: p. 261-264.
57. Peng, X., Nelson, E.S., Maiers, J.L., DeMali, K. *New Insights into Vinculin Function and Regulation*. Int. Rev. Cell Mol. Biol., 2011. **287**: Chapter 5.
58. Gilmore, A.P. and Burridge, K. *Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol -4, 5-bisphosphate*. Nature, 1996. **381**: p. 531-535.

59. Cohen, D., Kutscher, B., Chen, H., Murphy, D.B., Craig S. *A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of talin-vinculin complex at focal adhesions*. J. Biol. Chem., 2006. **281**(23): p. 16006-16015.
60. Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., Ballestrem, C. *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. J. Cell Biol., 2007. **179**(5): p. 1043-1057.
61. Isenberg, G., Nigglib, V., Pieper, U., Kaufmann, S., Goldmann, W.H. *Probing phosphatidylinositol-phosphates and adenosine nucleotides on talin nucleated actin polymerization*. FEBS Lett., 1996. **397**: p. 316-320.
62. Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M., Albiges-Rizo, C. *Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides*. J. Biol. Chem., 2001. **276**: p. 21217-21227.
63. Lee, S.Y., Voronov, S., Letinic, K., Nairn, A., Di Paolo, G., De Camilli, P. *Regulation of the interaction between PIPKI and talin by prolin-direct protein kinase*. J. Cell Biol., 2005. **168**: p. 789-799.
64. Chandraesekar, I., Stradal, T.E.B., Holt, M.R., Entschladen, F., Jockusch, B.M., Ziegler, W.H. *Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover*. J. Cell Sci., 2005. **118**: p. 1461-1472.
65. Saunders, R.M., Holt, M.R., Jennings, L., Sutton, D.H., Barsukov, I.L., Bobkov, A., Liddington, R.C., Adamson, E.A., Dunn, G.A., Critchley, D.R. *Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover*. Eur. J. Cell Biol., 2006. **85**: p. 487-500.
66. Thievensen, I., Thompson, P.M., Berlemont, S., Plevock, K.M., Plotnikov, S.V., Zemljic-Harpf, A., Ross, R.S., Davidson, M.W., Danuser, G., Campbell, S.L., Waterma, C.M. *Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth*. J. Cell Biol., 2013. **202**: p. 163-177.
67. Chinthalapudi, K., Rangarajan, E.S., Patil, D.N., George, E.M., Brown, D.T., Izard, T. *Lipid binding promotes oligomerization and focal adhesion activity of vinculin*. J. Cell Biol., 2014. **207**(5): p. 643-656.
68. DeMali, K.A. *Vinculin- a dynamic regulator of cell adhesion*. Trends Biochem. Sci., 2004. **29**: p. 565-567.
69. Roberts, M., Barry, S., Woods, A., Van der Sluijs, P.; Norman, J. *PDGF-regulated rab4-dependent recycling of $\alpha\beta 3$ integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading*. Curr. Biol., 2001. **11**: p. 1392-1402.
70. Laukatis, C.M., Webb, D.J., Donais, K., Horwitz, A.F. *Differential dynamics of $\alpha 5$ integrin, paxillin and α -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells*. J. Cell Biol., 2001. **153**(7): p. 1427-1440.
71. Ezratty, E., Partridge, M.A., Gundersen, G.G. *Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase*. Nat. Cell Biol., 2005. **7**: p. 581-590.
72. Pellinen, T., Arponen, A., Vuoriluoto, K., Kallio, K., Fransen, J.A.M., Ivaska, J. *Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of $\beta 1$ -integrins*. J. Cell Biol., 2006. **173**(5): p. 767-780.
73. Valdembrì, D. and Serini, G. *Regulation of adhesion site dynamics by integrin traffic*. Curr. Op. Cell Biol., 2012. **24**: p. 582-591.
74. Parsons, J.T., Horwitz, A.R., Schwartz, M.A. *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2011. **11**: p. 633-643.

75. Márquez, M.G., Fernandez-Tomé, M.C., Favale, N.O., Pescio, L.G., Sterin-Speziale, N.B. *Bradykinin modulates focal adhesions and induces stress fiber remodelling in renal papillary collecting duct cells*. Am. J. Phys. Renal Physiol., 2008. **294**: p. 603-613.
76. Schanstra, J.P., Alric, C. *Renal bradykinin receptors: localization, transduction pathways and molecular basis for a possible pathological role*. Int. J. Mol. Med., 1999. **3**: p. 185-191.
77. Simons, K. and Toomre, D. *Lipid rafts and signal transduction*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2000. **1**: p. 31-39.
78. Zajchowski, L.D. and Robbins, S.M. *Lipids rafts and little caves*. Eur. J. Biochem., 2002. **269**: p. 737-752.
79. Leeb-Lundberg, F.L.M., Song, X.H., Mathis, S.A. *Focal Adhesion- Associated Protein p125FAK and paxillin are substrates for Bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells*. J. Biol. Chem., 1994. **268**(39): p. 24328-24334.
80. Jockusch, B.M. and Rüdiger, M. *Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation*. Trends Cell Biol., 1996. **6**: p. 311-314.
81. Subauste, M.C., Pertz, O., Adamson, E.D., Turner, C.E., Junger, S., Hahn, K.M. *Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility*. J. Cell Biol., 2004. **165**: p. 371-381.
82. Lee, S., Otto, J.J. *Vinculin and talin: kinetics of entry and exit from the cytoskeletal pool*. Cell Motil. Cyt., 1997. **36**: p. 101-111.
83. Peng, X., Cuff, L.E., Lawton, C.D., DeMali, K.A. *Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to α -catenin*. J. of Cell Sci., 2010. **123**: p. 567-577.
84. Chen, H., Cohen, D.M., Choudhury, D.M., Kioka, N., Craig, S.W. *Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells*. J. Cell Biol., 2005. **169**: p. 459-470.
85. Xu, W., Baribault, H., Adamson, E.D. *Vinculin knockout results in heart and brain defect during embryonic development*. Development, 1998. **125**: p. 327-337.
86. Kawahara, E., Tokuda, R., Nakanishi, I. *Migratory phenotypes of HSC-3 squamous carcinoma cell line induced by EGF and PMA: relevance to migration of loosening of adhesion and vinculin-associated focal contacts with prominent filopodia*. Cell Biol. Int., 1999. **23**: p. 163-174.
87. Somiari, R.I., Sullivan, A., Russell, S., Somiari, S., Hu, H., Jordan, R. *Hightthroughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast*. Proteomics, 2003. p. 1863-1873.
88. Olson, T.M., Illenberger, S., Kishimoto, N.Y., Huttelmaier, S., Keating, M.T., Jockusch, B.M. *Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2002. **105**: p. 431-437.
89. Vasile, V.C., Edwards, W.D., Ommen, S.R., Ackerman, M.J. *Obstructive hypertrophic cardiomyopathy is associated with reduced expression of vinculin in the intercalated disc*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006. **349**: p. 709-715.
90. Han, M.K.L. and Rooij, J. *Converging and Unique Mechanisms of Mechanotransduction at Adhesion Sites*. Trends Cell Biol., 2016. **125**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.005>
91. Wen, K.K., Rubenstein, P.A., DeMali, K.A. *Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure*. J. Biol. Chem., 2009. **284**: p. 30463-30473.
92. DeMali, K.A., Burridge, K. *Coupling membrane protrusion and cell adhesion*. J. Cell Sci., 2003. **116**: p. 2389-2397.
93. Hotulainen, P., Lappalainen, P. *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. J. Cell Biol., 2006. **173**: p. 383-394.

94. Zamir, E. and Geiger, B. *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J. Cell Sci., 2001. **114**: p. 3583-3590.
95. Huber, F., Boire, A., Preciado López, M., Koenderink, G.H. *Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up*. Curr. Op. Cell Biol., 2014. **32**: p. 39-47.
96. Bertaud, J., Qin, Z., Buehler, M.J. *Intermediate filament-deficient cells are mechanically softer at large deformation: a multiscale simulation study*. Acta Biomater., 2010. **6**: p. 2457-2466.
97. Bhushan, V.D., Harmon, R.M., Green, K.J. *Desmosomes at a glance*. J. Cell Sci., 2009. **122**: p. 4401-4407.
98. Naumanen, P., Lappalainen, P., Hotulainen, P. *Mechanisms of actin stress fiber assembly*. J. Microsc., 2008. **231**: p. 446-454.
99. Small, V., Rottner, K., Kaverina, I., Anderson, K.I. *Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement*. Biochim. Biophys. Acta, 1998. **1404**: p. 271-281.
100. Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P.W., Lappalainen, P.A. *Molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers*. Curr. Biol., 2011. **21**: p. 539-550.
101. Kovacs, E.M., Goodwin, M., Ali, R.G., Peterson, A.D., Yap, A.S. *Cadherin-directed actin assembly: E-Cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts*. Curr. Biol., 2002. **12**: p. 379-382.
102. Bellett, G., Carter, J.M., Keynton, J., Goldspink, D., James, C., Moss, D.K., Mogensen, M.M. *Microtubule plus-end and minus-end capture at adherens junctions is involved in the assembly of apico-basal arrays in polarized epithelial cells*. Cell Motil. Cytosk., 2009. **66**: p893-908.
103. Stehbens, S.J., Paterson, A.D., Crampton, M.S., Shewan, A.M., Ferguson, C., Akhmanova, A., Parton, R.G., Yap, A.S. *Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts*. J. Cell Sci., 2006. **119**: p. 1801-1811.
104. Kusumi, A., Suzuki, K.G.N, Kasai, R.S., Ritchie, K., Fujiwara, T.K. *Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane*. Trends Biochem. Sci., 2011. **36**(11): p. 604-615.
105. Simons, K. and Ikonen, E. *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**: p. 569-572.
106. Brown, D.A., London, E. *Structure and function of sphingolipid-and cholesterol-rich membran rafts*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 17221-17224.
107. Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson G.W. *Membrane lipids: where they are and how they behave*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2008. **9**(2): p. 112-124.
108. Hoekstra, D., Maier, O., Van der Wouden, J.M., Slimane, T.A., Van Ijzendoorn, S.C.D. *Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids*. J. Lipid Res., 2003. **44**: p. 869-877.
109. Rodríguez-Boulán, E., Kreitzer, G., Musch, A. *Organization of vesicular trafficking in epithelia*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2005. **6**: p. 233-247.
110. Van Hengel, J., Gohon, L., Bruyneel, E., Vermeulen, S., Cornelissen, M., Mareel, M., van Roy, F. *Protein kinase C activation upregulates intercellular adhesion of α -catenin-negative human colon cancer cell variants via induction of desmosomes*. J. Cell Biol., 1997. **137**: p. 1103-1116.
111. Ozawa, M., Ringwald, M., Kemler, R. *Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990. **87**: p. 4246- 4250.
112. Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Gauthier-Rouvière, C. *N-Cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts*. Mol. Biol. Cell, 2005. **16**: p. 2168-2180.

113. Márquez, M.G., Leocata Nieto, F., Favale, N., Fernandez-Tomé, M.C., Sterin-Speziale, N. *Membrane lipid composition plays a central role in maintaining epithelial cell adhesion to extracellular matrix*. *Lipids*, 2008. **43**: p. 343-352.
114. Márquez, M.G. and Sterin-Speziale, N.B. *Is DRM lipid composition relevant in cell-extracellular matrix adhesion structures?* *Cell Adh. Migrat.*, 2008. **2**(3): p. 180-183.
115. Márquez, M.G., Favale, N.O., Leocata Nieto, F., Pescio, L.G., Sterin-Speziale N.B. *Changes in membrane lipid composition causes alterations of epithelial cell-cell adhesion structures in renal papillary collecting duct cells*. *Biochim. Biophys. Acta- Biomem.*, 2012. **1818**(3): p. 491-501.
116. Goni, F.M. *Biophysics (and sociology) of ceramides*. *Biochem. Soc. Symp.*, 2005. **72**: p. 177-188.
117. Futerman, A.H., Stieger, B., Hubbard, A.L., Pagano, R.E. *Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus*. *J. Biol. Chem.*, 1990. **265**(15): p. 8650-7.
118. Yamaoka, S., Miyaji, M., Kitano, T., Umehara, H., Okazaki, T. *Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells*. *J. Biol. Chem.*, 2004. **279**: p. 18688-93.
119. Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F.H.M., Holthuis, J.C.M. *Identification of a family of animal sphingomyelin synthases*. *EMBO J*, 2004. **23**(1): p. 33-44.
120. Hanada, K. *Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide*. *Mol. Cell Biochem.*, 2006. **286**(1-2): p. 23-31.
121. Merryll, A.H., Jones, D.D. *An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990. **1044**: p. 1-12.
122. Van, M.G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. *Membrane lipids: where they are and how they behave*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008. **9**: p. 112-124.
123. Riboni, L., Prinetti, A., Bassi, R., Tettamanti, G. *Formation of bioactive sphingoid molecules from exogenous sphingomyelin in primary cultures of neurons and astrocytes*. *FEBS Lett*, 1994. **352**(3): p. 323-6.
124. Riboni, L., Bassi, R., Caminiti, A., Prinetti, A., Viani, P., Tettamanti, G. *Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects*. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998. **845**: p. 46-56.
125. Chatelut, M., Leruthb, M., Harzerc, K., Dagand, A., Marchesinie, S., Gattdd, S., Salvayrea, R., Courtoy, P., Levadea, T. *Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue*. *FEBS Lett*, 1998. **426**(1): p. 102-6.
126. Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., Guzmán, M. *De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis*. *Biochem. J.*, 2002. **363**(1): p. 183-188.
127. Neumann, S., and van Meer, G. *Sphingolipid management by an orchestra of lipid transfer proteins*. *Biol. Chem.*, 2008. **389**(11): p. 1349-1360.
128. McLaughlin, S. and Murray, D. *Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics*. *Nature*, 2005. **438**: p. 605-611.
129. Johnson, J.E., and Cornell, R.B. *Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions*. *Mol. Memb. Biol.*, 1999. **16**: p. 217-235.
130. Lee, A.G. *How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach*. *Mol. Biosyst.*, 2005. **1**: p. 203-212.
131. Marsh, D. *Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008. **1778**: p. 1545-1575.

132. Kazuo, E., Hironori, I., Yasunori, K., Shuh N., Masato, U.. *Local Change in Phospholipid Composition at the Cleavage Furrow Is Essential for Completion of Cytokinesis*. J. Biol. Chem., 2005. **280**(45): p. 37901–37907.
133. Li, Z., Hailemariam, T.K., Zhou, H., Li, Y., Duckworth, D.C., Peake, D.A., Zhang, Y., Kuo, M.S., Cao, G., Jiang, X.C. *Inhibition of sphingomyelin synthase (SMS) affects intracellular sphingomyelin accumulation and plasma membrane lipid organization*. Biochem. Biophys. Acta, 2007. **1771**: p. 1186–1194.
134. van der Luit, A.H., Budde, M., Zerp, S., Caan, W., Klarenbeek, J.B., Verheij, M., van Blitterswijk, W.J. *Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts*. Biochem. J., 2007. **401**: p. 541–549.
135. Favale, N.O., Santacreu, B.J., Pescio, L.G., Márquez, M.G., Sterin-Speziale, N. *Sphingomyelin metabolism is involved in the differentiation of MDCK cells induced by environmental hypertonicity*. J. Lipid Res., 2015. **56**: p. 786–800.
136. Goldenring, J. *Recycling endosomes*. Curr. Op. Cell Biol., 2015. **35**: p. 117–122.
137. Desclozeaux, M., Venturato, J., Wylie, F.G., Kay, J.G., Joseph, S.R., Le, H.T., Stow, J.L. *Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherin trafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis*. Am. J. Physiol. - Cell Physiol., 2008. **295**: C545–C556.
138. Thompson, A., Nessler, R., Wisco, D., Anderson, E., Winckler, B., Sheff, D. *Recycling Endosomes of Polarized Epithelial Cells Actively Sort Apical and Basolateral Cargos into Separate Subdomains*. Mol. Biol. Cell, 2007. **18**: p. 2687–2697.
139. Stenmark, H. *Rab GTPases as coordinators of vesicles traffic*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2009. **8**: p. 513–525.
140. Xie, S., Naslavsky, N., Caplan, S. *Diacylglycerol kinase alpha regulates tubular recycling endosome biogenesis and major histocompatibility complex class I recycling*. J. Biol. Chem., 2014. **289**: p. 31914–31926.
141. Rahajeng, J., Giridharan, S.S., Cai, B., Naslavsky, N., Caplan, S. *MICAL1 is a tubular endosomal membrane hub that connects Rab35 and Arf6 with Rab8a*. Traffic, 2012. **13**: p. 82–93.
142. Greer, Y.E., Westlake, C.J., Gao, B., Bharti, K., Shiba, Y., Xavier, C.P., Pazour, G.J., Yang, Y., Rubin, J.S. *Casein kinase 1delta functions at the centrosome and Golgi to promote ciliogenesis*. Mol. Biol. Cell, 2014. **25**: p. 1629–1640.
143. Woodman, P.G. *Biogenesis of the Sorting Endosome: The Role of Rab5*. Traffic, 2000. **1**: p. 695–701.
144. Baetz, N.W., Goldenring, J.R. *Rab11-Family Interacting Proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system*. Mol. Biol. Cell, 2013. **24**: p. 643–658.
145. Subathra, M., Qureshi, A., Luberto, C. *Sphingomyelin Synthases Regulate Protein Trafficking and Secretion*. PLoS One, 2011. **6**(9): e23644.
146. Márquez, M.G., Fernández-Tomé, M.C., Favale, N.O., Pescio, L.G., Sterin-Speziale, N.B. *Bradykinin induces the formation of vesicle-like structures containing vinculin and PtdIns(4,5)P2 in renal papillary collecting duct cells*. Am. J. Phys. Renal Physiol., 2009. **297**: F1181–F1191.
147. Di Paolo, G., and De Camilli, P. *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. Nature, 2006. **443**: p. 651–657.

148. Jost, M., Simpson, F., Kavran, J.M., Lemmon, M.A., Schmid, S.L. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation*. Curr. Biol., 1998. **8**: p. 1399-1402.
149. Martin, T. *PI(4,5)P2 regulation of surface membrane traffic*. Curr. Op. Cell Biol., 2001. **13**: p. 493-499.
150. Sun, Y., Carroll, S., Kaksonen, M., Toshima, J.Y., Drubin, D.G. *PtdIns(4,5)P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization*. J. Cell Biol., 2007. **177**: p. 355-367.
151. Kinuta, M., Yamada, H., Abe, T., Watanabe, M., Li, S., Kamitani, A., Yasuda, T., Matsukawa, T., Kumon, H., Takei, K. *Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate stimulates vesicle formation from liposomes by brain cytosol*. PNAS, 2002. **99**(5): p. 2841-2847.
152. Hales, C.M., Vaerman, J.P., Goldenring, J.R. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 50415–50421.
153. Anitei, M. and Hoflack, B. *Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways*. Nat. Cell Biol., 2012. **14**(1): p. 11-19.
154. Bananis, E. Murray, J.W, Stockert, R.J., Satir, P., Wolkoff, A.W. *Microtubule and motor-dependent endocytic vesicle sorting in vitro*. J. Cell Biol., 2000. **151**: p. 179–186.
155. Bananis, E. Nath, S., Gordon, C., Satir, P., Stockert, R.J., Murray, J.W., Wolkoff, A.W. *Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin*. Mol. Biol. Cell, 2004. **15**: p. 3688–3697.
156. Klopfenstein, D.R., Tomishige, M., Stuurman, N., Val, R.D. *Role of phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor*. Cell, 2002. **109**: p. 347–358.
157. Schumacher, K. *The influence of culture media on embryonic renal collecting duct cell differentiation in vitro*. Cell Dev. Biol. Anim., 1999. **35**(8): p. 465-71.
158. Minuth, W.W. *Electrolyte environment modulates differentiation in embryonic renal collecting duct epithelia*. Exp. Nephrol., 1997. **5**(5): p. 414-22.
159. Minuth, W.W., Gilbert, P., Lauer, C., Aktories, K., Cross, P. *Differentiation properties of renal collecting duct cells in culture*. Differentiation, 1986. **33**: p. 156-167.
160. Stokes, J.B., Grupp, C., Kinne, R.K.H. *Purification of rat papillary collecting duct cells: functional and metabolic assessment*. Am. J. Physiol., 1987. **253**: F251-262.
161. Lakshmiopathi, K., Kim, F., Campagna, A., Koul, S., Meacham, R.B., Koul, H.K. *Primary Culture and Characterization of Human Renal Inner Medullary Collecting Duct Epithelial Cells*. J. of Urol., 2008. **179**: p. 2057-2063.
162. Lowry, O.H. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 1951. **193**(1): p.265-75.
163. Bordier, C. *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. J. Biol. Chem., 1981. **256**: p. 1604–1607.
164. Barile, M., Pisitkun, T., Yu, M.J., Chou, C.L., Verbalis, M.J., Shen, R.F., Knepper, M. *Large Scale Protein Identification in Intracellular Aquaporin-2 Vesicles from Renal Inner Medullary Collecting Duct*. Mol. Cell Proteom., 2005. **4**: p. 1095–1106.
165. Crowell, A.M.J., Wall, M.J., Doucette, A. *Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation*. Anal. Chim. Acta, 2013. **796**: p. 48–54.
166. Manders, E.M.M., Verbeek, F.J., Aten, J.A. *Measurements of colocalization of objects in dual-colour confocal images*. J. Micros., 1993. **169**: p. 375–382.

167. Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., Kam, Z. *Molecular diversity of cell-matrix adhesions*. J. Cell Sci., 1999. **112**: p. 1655-1669.
168. Leichtweiss, H.P., Lübbers, D.W., Weiss, C.H., Baumgärtl, H., Reschke, W. *The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO₂*. Pflügers Arch., 1969. **309**: p. 328-349.
169. Murata, F., Tsuyama, S., Suzuki, S., Hamada, H., Ozawa, M., Muramatsu, T. *Distribution of glycoconjugates in the kidney studied by use of labeled lectins*. J. Histochem. Cytochem., 1983. **31**: p. 139-144.
170. Schulte, B.A., Spicer, S. *Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates*. Am. J. Anat., 1983. **168**: p. 345-362.
171. Damjanov, I. *Biology of the disease: lectin cytochemistry and histochemistry*. Lab. Invest., 1987. **57**: p. 5-20.
172. Michael, L., Sweeney, D.E., Davies, J.A. *The lectin Dolichos biflorus agglutinin is a sensitive indicator of branching morphogenetic activity in the developing mouse metanephric collecting duct system*. J. Anat., 2007. **210**: p. 89-97.
173. Márquez, M.G., Cabrera, I., Serrano, D.J., Sterin-Speziale, N.B. *Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development*. Anat. Embriol., 2002. **205**: p. 431-440.
174. Mayle, K.M., Le A.M., Kamei, D.T. *The intracellular trafficking pathway of transferrin*. Biochim. Biophys. Acta, 2012. **1820**: p. 264-281.
175. Daro, E., van Der Sluijs, P., Galli, T., Mellman, I. *Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996. **93**: p. 9559-9564.
176. Efimov, A., Schiefermeier, N., Grigoriev, I., Brown, M.C., Turner, C.E., Small, J.V., Kaverina, I. *Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites*. J. Cell Sci., 2008. **121**: p. 196-204.
177. Schoenwaelder, S.M., Yuan, Y., Cooray, P., Salem, H.H., Jackson, S.P. *Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α IIb β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots*. J. Biol. Chem., 1997. **272**: p. 1694-1702.
178. Ecelbarger, C.A., Terris, J., Frindt, G., Echevarria, M., Marples, D., Nielsen, S., Knepper, M.A. *Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney*. Am. J. Physiol., 1995. **269**: F663-F672.
179. Rodal, S., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., Sandvig, K. *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. Mol. Biol. Cell., 1999. **10**(4): p. 961-74.
180. Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T., McLaughlin, S. *Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)*. Biochim. Biophys. Acta, 1989. **979**: p. 105-112.
181. Yan, Q., Sun, W., Kujala, P., Lotfi, Y., Vida, T.A., Bean, A.J. *CART: an Hrs/actinin-4/BERP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling*. Mol. Biol. Cell, 2005. **16**: p. 2470-2482.
182. Betapudi, V. *Myosin II motor proteins with different functions determine the fate of lamellipodia extension during cell spreading*. PLoS One, 2010. **5**(1): e8560.
183. Zhang, L., Ashendel, C.L., Becker, G.W., Morré, D.J. *Isolation and characterization of the principal ATPase associated with transitional endoplasmic reticulum of rat liver*. J. Cell Biol., 1994. **127**: p. 1871-1883.

184. Kaverina, I., Rottner, K., Small, J. *Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions*. J. Cell Biol., 1998. **142**: p. 181–190.
185. Pfeffer, S.R., Drubin, D.G., Kelly, R.G. *Identification of Three Coated Vesicle Components as α - and β -Tubulin Linked to a Phosphorylated 50,000-dalton Polypeptide*. J. Cell Biol., **1983**. 97: p. 40-47.
186. Hsiao, J.H.T., Fu, Y., Hill, A.F., Halliday, G.M., Kim, W.S. *Elevation in Sphingomyelin Synthase Activity Is Associated with Increases in Amyloid Beta Peptide Generation*. PLoS One, 2013. **8**(8): e74016.
187. Sillence, D.J. and Platt, F.M. *Storage diseases: new insights into sphingolipid functions*. Trends Cell Biol., 2003. **13**(4): p. 195-203.